



Eugénia Maria Neves Rasteiro

Licenciada em Bioquímica

Avaliação das propriedades antioxidantes e antimutagénicas de diferentes cultivares de *Vaccinium spp*, do grupo “Southern Highbush”, produzidas em Portugal

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Professora Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte,
Professora Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes
Arguente: Prof. Doutora Ana Sofia Gregório Fernandes
Vogal: Prof. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março 2012



Eugénia Maria Neves Rasteiro

Licenciada em Bioquímica

Avaliação das propriedades antioxidantes e antimutagénicas de diferentes cultivares de *Vaccinium spp.*, do grupo “Southern Highbush”, produzidas em Portugal

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Professora Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte,
Professora Auxiliar, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes
Arguente: Prof. Doutora Ana Sofia Gregório Fernandes
Vogal: Prof. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março 2012

Copyright – Eugénia Maria Neves Rasteiro, UNL, FCT

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

É da minha vontade deixar aqui expresso o meu agradecimento e reconhecimento a todas as pessoas, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço em particular:

À Professora Doutora Benilde Mendes, coordenadora deste Mestrado, por me ter proporcionado as condições necessárias para a realização deste trabalho e pela atenção que sempre me demonstrou.

À Professora Doutora Maria Paula Duarte pela excelente orientação, permanente disponibilidade, paciência, incentivo e encorajamento. Agradeço a sua dedicação e empenho na condução do trabalho experimental e na revisão minuciosa do texto. Agradeço ainda pelos conhecimentos que me transmitiu ao longo deste trabalho, pelas suas sugestões e ideias bem como pela confiança que em mim depositou. Sem a sua ajuda e dedicação não teria sido possível a concretização deste trabalho.

Ao Professor Doutor José Rueff, diretor do Departamento de Genética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, por me ter recebido e disponibilizado as instalações e os equipamentos necessários à realização do ensaio ORAC.

À empresa Mirtisul – Produção de Mirtilos Lda, localizada na Aldeia do Pico – Grândola, que tão generosamente me receberam e disponibilizaram as amostras das cultivares de mirtilo, sem as quais não teria sido possível a realização deste trabalho.

À Mirtilusa, Sociedade de Produtores Horto-frutícolas, Sever do Vouga, por me terem recebido e disponibilizado amostras de cultivares que, embora não sejam objeto de estudo neste trabalho, foram utilizadas no desenvolvimento das teses dos meus colegas Susana Carreira e Pedro Oliveira.

Aos meus colegas, Susana Carreira e Pedro Oliveira, pelo apoio e colaboração prestada na realização de todo o trabalho experimental e no tratamento dos resultados, bem como pelo incentivo e encorajamento nos momentos mais difíceis. Agradeço ainda às suas mães (D. Lurdes e D. Fátima) pelo apoio que me deram ao longo deste percurso.

Aos meus amigos Telma, Cláudia, Nuno e Fernando Rodrigues pelo apoio e ajuda que me prestaram na elaboração deste trabalho.

À minha irmã, cunhado e aos meus amigos, em especial à Alexandra Fontes, pela amizade e pelas palavras de encorajamento.

Aos meus pais, por me apoiarem em todas as etapas da minha vida e que, durante este período, se viram por vezes privados da minha companhia.

Resumo

Estudaram-se as atividades antioxidante (ensaios FRAP, CUPRAC, ORAC, quelação de ferro e sequestro de peróxido de hidrogénio e do radical anião superóxido) e antimutagénica (teste de Ames) em seis diferentes cultivares de mirtilo do grupo “Southern Highbush” (O’Neal, Star, Georgia Gem, Sharpblue, Misty e Jubilee) produzidas em modo biológico, no ano de 2010, no Sul de Portugal. Estas atividades foram correlacionadas com o teor em fenóis totais, antocianinas e sólidos solúveis.

Todas as variedades analisadas apresentam atividade antioxidante, detetada através da avaliação da atividade redutora e de sequestro de espécies reativas de oxigénio, bem como atividade antimutagénica, não tendo demonstrado capacidade de quelação de Fe(II).

Das várias variedades estudadas, a Sharpblue foi a que apresentou teores de fenóis e antocianinas mais elevados, tendo apresentado a maior capacidade antioxidante em todos os ensaios realizados. Em contrapartida, a cultivar Misty apresentou o teor em fenóis mais baixo e a menor capacidade antioxidante nos ensaios FRAP, CUPRAC e sequestro do peróxido de hidrogénio. A cultivar O’Neal foi a que apresentou menor atividade ORAC e a Georgia Gem o menor teor de antocianinas. As diversas atividades antioxidantes parecem estar relacionadas com os compostos fenólicos e, particularmente, com as antocianinas no caso do sequestro do peróxido de hidrogénio.

Palavras-chave: Mirtilo; Southern Highbush; compostos fenólicos; antocianinas; atividade antioxidante; atividade antimutagénica.

Abstract

In this study it was investigated the antioxidant activity (FRAP assays, CUPRAC, ORAC, iron chelating activity, hydrogen peroxide scavenging and superoxide anion radical scavenging) and the antimutagenic activity (Ames test) of six Southern Highbush blueberry cultivars (O'Neal, Star, Georgia Gem, Sharpblue, Misty and Jubilee) organically produced, in 2010, in southern Portugal. These activities were correlated with the content of total phenolics, anthocyanins, and soluble solids.

All analyzed blueberry cultivars presented antioxidant activity, detected by the evaluation of the reductive activity and the scavenging of reactive oxygen species, and the antimutagenic activity. The ferrous ions chelating activity of the samples was not demonstrated.

From the several studied cultivars, the Sharpblue had the higher level of total phenolics and anthocyanins, and showed the highest antioxidant capacity in all methods. In contrast, the cultivar Misty had the lowest total phenolics content and antioxidant capacity in FRAP assays, CUPRAC and hydrogen peroxide scavenging. O'Neal cultivar showed the lowest ORAC values and the Georgia Gem the lowest amount of anthocyanins. Various antioxidant activities seem to be correlated to the total phenolics and particularly there was a significant correlation between hydrogen peroxide scavenging and total anthocyanins.

Key-words: Blueberry; Southern Highbush; phenolic compounds; antioxidant capacity; antimutagenicity.

Índice de Matérias

Introdução	1
1. O mirtilo	4
1.1. Diversidade genética no Género <i>Vaccinium</i>	5
1.2. Produção de mirtilos em Portugal	6
1.3. O cultivo do mirtilo	7
1.4. Fatores de qualidade do fruto	8
1.5. Composição química e valor nutricional	8
1.6. Propriedades funcionais dos mirtilos	11
2. Antioxidantes e antimutagêneos alimentares	14
2.1. Espécies reativas de oxigénio (ROS) e sua ação biológica	14
2.2. Mecanismos celulares de defesa antioxidante	17
2.3. Os polifenóis	20
2.3.1. Os flavonoides	23
2.3.1.1. As antocianinas	26
2.3.2. Biodisponibilidade dos polifenóis	27
2.3.3. Propriedades pró-oxidantes dos polifenóis	29
2.4. Mutagêneos e antimutagêneos alimentares	30
3. Materiais e métodos	34
3.1. Caracterização das amostras de mirtilos	34
3.2. Reagentes e meios de cultura	35
3.3. Preparação dos extratos	35
3.4. Determinação do teor de sólidos solúveis (grau Brix)	36
3.5. Determinação dos fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu	37
3.6. Quantificação das antocianinas monoméricas totais pelo método do pH diferencial.....	38
3.7. Avaliação da capacidade antioxidante	39
3.7.1. Determinação da capacidade de quelação de Fe(II)	39

3.7.2. Determinação da capacidade de sequestro do peróxido de hidrogénio	40
3.7.3. Determinação da capacidade de sequestro do radical anião superóxido	41
3.7.4. Determinação da capacidade de redução do Cu(II) pelo ensaio CUPRAC ("Cupric Reducing Antioxidant Capacity")	42
3.7.5. Determinação da atividade de redução do Fe(III) pelo ensaio FRAP ("Ferric Reduction Antioxidant Power")	43
3.7.6. Análise do resgate do radical peroxilo pelo ensaio ORAC ("Oxygen Radical Absorbance Capacity")	45
3.8. Avaliação da atividade mutagénica e antimutagénica através do Teste de Ames...	46
3.8.1. Caracterização da estirpe de <i>S. typhimurium</i> utilizada	47
3.8.2. Realização dos testes de Ames	48
3.9. Análise estatística dos resultados	49
4. Resultados e discussão	50
4.1. Determinação do teor de sólidos solúveis (grau Brix), fenóis e antocianinas totais	50
4.2. Determinação da capacidade antioxidante	54
4.2.1. Determinação da capacidade de quelação do ferro	54
4.2.2. Determinação da atividade antioxidante por mecanismo de transferência eletrónica: ensaios FRAP e CUPRAC	55
4.2.3. Determinação da atividade antioxidante por sequestro de espécies reativas de oxigénio: peróxido de hidrogénio, radical anião superóxido e radical peroxilo (ensaio ORAC)	57
4.3. Avaliação da atividade antimutagénica	60
5. Conclusões finais	63
6. Referências bibliográficas	66

Índice de figuras

Figura 1.1 – Aspeto do fruto do mirtilo, <i>Vaccinium spp</i>	4
Figura 2.1 – Classificação de antioxidantes	19
Figura 2.2 – Principais classes de compostos fenólicos	21
Figura 2.3 – Estrutura básica de alguns compostos fenólicos	22
Figura 2.4 – Estrutura base dos flavonoides composta por dois anéis benzénicos (A e B) ligados através de um anel pirano (C).....	24
Figura 2.5 – Estrutura básica de alguns tipos de flavonoides	24
Figura 2.6 – Estrutura de algumas antocianidinas, metabolitos resultantes da metabolização das antocianinas presentes nos mirtilos	27
Figura 2.7 – Diagrama esquemático dos passos envolvidos na indução de mutações	31
Figura 2.8 – Diagrama esquemático mostrando pontos nos quais os antimutagénicos obtidos através da dieta podem ter um impacto na probabilidade de um determinado agente mutagénico originar mutações	32
Figura 3.1 – (A) Aspeto geral do arbusto do grupo Southern Highbush (híbridos interespecíficos de <i>V. corymbosum L.</i>) e (B) Aspeto dos frutos em diferentes estágios de maturação	34
Figura 3.2 – Diferentes fases do processo de extração utilizado. (A) Extração em banho de gelo com metanol acidificado; (B) Recuperação do filtrado; (C) Evaporação do solvente	36
Figura 3.3 – Transformação estrutural reversível das antocianinas monoméricas em função do pH	38
Figura 3.4 – Redução do NBT ²⁺ (A) pelo radical anião superóxido, dando origem ao azul de formazano (B), que pode ser doseado espectrofotometricamente a 560 nm	41
Figura 3.5 – Formação do radical anião superóxido através do sistema PMS/NADH	41
Figura 3.6 – Redução do complexo Cu(II) – neocuproína a Cu(I) – neocuproína, por ação dos antioxidantes da amostra	43
Figura 3.7 – Formação do complexo (Fe ²⁺ -TPTZ) após redução do Fe ³⁺ por um antioxidante	44
Figura 3.8 – Reação de oxidação do AAPH	45

Figura 3.9 – Esquema das reações elementares ocorridas no ensaio ORAC. O AAPH produz os radicais peroxilo que oxidam a fluoresceína. Na presença de um antioxidante (AH), este desativa o radical peroxilo, dando origem a compostos não reativos (ROOH e ROOA), ($R_1=COOH$ e $R_2=OCOOH$)	45
Figura 4.1 – Teor em fenóis totais (mg eq ácido gálico/100 g), antocianinas monoméricas totais (mg equivalentes cianidina/100 g) e grau Brix (%) nas cultivares de mirtilo em estudo	53
Figura 4.2 – Capacidade antioxidante das diferentes amostras nos ensaios FRAP (mmol Fe^{2+} /100 g) e CUPRAC (mmol eq de ácido ascórbico/100 g)	56
Figura 4.3 – Curva de dose-resposta do t-BHP com a estirpe TA100	60
Figura 4.4 – Curvas de dose-resposta das diferentes variedades de mirtilos em estudo: A) O’Neal, B) Star, C) Georgia Gem, D) Sharpblue, E) Misty e F) Jubilee, na estirpe TA100, na ausência (—■—) e na presença (—▲—) de 1,11 μ mol de t-BHP/placa	61
Figura 4.5 – Percentagem de inibição da mutagenicidade do t-BHP, na estirpe TA100, com os extratos obtidos a partir das diferentes cultivares de mirtilo em estudo, nas diferentes doses testadas	62

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Algumas características das cultivares do grupo “Southern Highbush”.....	6
Tabela 1.2 – Composição química média de frutos de mirtilo do género <i>Vaccinium</i> (grupos “Highbush” (<i>V. corymbosum</i> e <i>V. ashei</i>) e “Lowbush” (<i>V. augustifolium</i>)) por 100 g de parte edível	9
Tabela 1.3 – Teor de antocianinas, flavanóis e flavonóis de frutos de mirtilo do género <i>Vaccinium</i> (grupos “Highbush” (<i>V. corymbosum</i> e <i>V. ashei</i>) e “Lowbush” (<i>V. augustifolium</i>)) por 100 g de parte edível.....	10
Tabela 3. 1 – Composição da gelose de superfícies (por litro).....	49
Tabela 3.2 – Composição do meio VB (por litro)	49
Tabela 4.1 – Teor de sólidos solúveis (grau Brix) e de fenóis e antocianinas totais, expresso por 100 g de peso fresco, das cultivares em estudo	50
Tabela 4.2 – Classificação da correlação em função do valor do coeficiente de correlação de Pearson	52
Tabela 4.3 – Coeficiente de Pearson para as correlações entre fenóis totais, antocianinas monoméricas totais e sólidos solúveis totais (°Brix)	53
Tabela 4.4 – Valores obtidos nos ensaios FRAP e CUPRAC	55
Tabela 4.5 – Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição em fenóis totais e antocianinas totais e as atividades FRAP e CUPRAC	57
Tabela 4.6 – Atividade antioxidante por sequestro de espécies reativas de oxigénio	58
Tabela 4.7 – Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição em fenóis totais e antocianinas totais e a atividade antioxidante dos vários extratos de mirtilo ...	59

Simbologia e Notações

AAPH - 2,2'-Azobis(2-metilpropionamidina) dihidroclorato

Abs - Absorvância

AUC - Área sob a curva

CCC - Códão Citosina – Citosina – Citosina

CTC - Códão Citosina – Timina – Citosina

CUPRAC - Cupric Reducing Antioxidant Capacity

CYPs - Citocromos P450

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

eq - Equivalente

f₀ - Fluorescência no minuto zero

FRAP - Ferric Reduction Antioxidant Power

GST - Glutathione-S-transferase

HAT - Transferência de um átomo de hidrogénio (Hydrogen atom transfer)

his - Histidina

HPLC - High-performance liquid chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

LDL - Lipoproteínas de baixa densidade

NADH - Dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma reduzida

NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma reduzida

NB - Meio de cultura Nutrien Broth

NBT²⁺ - Azul de nitrotetrazólio

ORAC - Oxygen Radical Absorbance Capacity

PMS - Metossulfato de fenazina

RNA - Ácido ribonucleico

ROS - Espécies Reativas de Oxigénio

rpm - Rotações por minuto

SET - Transferência de um eletrão (Single electron transfer)

SOD - Superóxido dismutase

spp - Espécies

t-BHP - *Tert*-butil-hidroperóxido

TPTZ - 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina

USDA - National Nutrient Database for Standard Reference

UV - Ultravioleta

VB - Meio de cultura Vogel - Bonner

λ - Comprimento de onda

λ_{max - vis} - Comprimento de onda de absorvância máxima no Visível

Introdução

Os alimentos funcionais são os que, naturalmente, ou quando modificados, possuem compostos com atividade fisiológica que, quando consumidos com regularidade, apresentam, para além do aporte nutritivo que lhes está associado, efeitos benéficos, cientificamente comprovados, sobre a saúde (Espín *et al.*, 2007).

Diversos estudos têm demonstrado a existência de uma correlação positiva entre o consumo de vegetais frescos e a prevenção e/ou atraso na evolução de diversas doenças crónicas, incluindo o cancro (revisto em Kris-Etherton *et al.*, 2002; Zafra-Stone *et al.*, 2007). Estes alimentos são uma fonte natural de compostos químicos que têm demonstrado possuir diversas propriedades específicas como, por exemplo, propriedades antioxidantes, antimutagénicas, antibacterianas, antiinflamatórias, antivirais ou antiangiogénicas. Diversas dessas substâncias parecem aumentar a expressão das enzimas de destoxificação, aumentar as defesas imunitárias do organismo, diminuir a agregação plaquetária, promover um perfil lipídico saudável e reduzir as doenças cardiovasculares (Zafra-Stone *et al.*, 2007).

Fatores de diversas origens têm vindo a ser associados ao aparecimento de espécies reativas de oxigénio (ROS). Esses fatores incluem, entre outros, um elevado consumo de álcool, o tabagismo, uma dieta desequilibrada, uma elevada exposição a radiação ultravioleta ou a exposição ambiental ou ocupacional a determinados compostos químicos (Oliveira *et al.*, 2009). Quando em elevadas concentrações, ou seja, quando em condições de “stress” oxidativo, as espécies reativas de oxigénio podem ser importantes mediadoras de danos em diversas estruturas celulares, tais como, lípidos, proteínas ou ácidos nucleicos. Os danos celulares causados pelo “stress” oxidativo têm vindo a ser implicados na etiologia de muitas doenças, salientando-se doenças degenerativas do sistema nervoso, como as doenças de Parkinson ou Alzheimer, cancro, aterosclerose e outras doenças cardiovasculares e do sistema imunitário, estando, igualmente, associadas ao processo de envelhecimento (Toyokuni, 1999; Valko *et al.*, 2007).

A ingestão de antioxidantes através da dieta pode constituir uma estratégia para prevenir ou atrasar a oxidação de substratos celulares e, desta forma, prevenir estas patologias (Esmaili e Sonboli, 2010). Verifica-se que a ingestão de uma combinação de vários frutos tem um efeito aditivo ou de sinergia nos efeitos resultantes da ação dos antioxidantes (Zafra-Stone *et al.*, 2007).

Os compostos fenólicos, tais como flavonoides, ácidos fenólicos, taninos ou estilbenos apresentam elevada capacidade antioxidante. Assim, frutos, plantas e especiarias ricos em compostos fenólicos têm captado cada vez mais o interesse da indústria alimentar, e da população em geral, como forma de melhorar a qualidade dos alimentos (Esmaeili e Sonboli, 2010), visando promover a saúde e retardar o processo de envelhecimento. Os pequenos frutos, particularmente os mirtilos (*Vaccinium spp*), são reconhecidos como uma importante fonte destes compostos, com propriedades antioxidantes, sendo, por isso, considerados alimentos benéficos para a saúde.

Em Portugal, a produção de mirtilos ronda as 400 toneladas/ano, sendo que cerca de 95% deste valor se destina ao mercado externo, quase exclusivamente à União Europeia, e apenas 5% ao mercado interno (Observatório dos Mercados Agrícolas e das Importações Agroalimentares, 2010). No entanto, os efeitos positivos sobre a saúde, que têm vindo a ser associados ao consumo deste fruto, têm-no tornado cada vez mais popular.

Diversos trabalhos têm demonstrado a existência nos mirtilos de compostos com atividade antioxidante, antiinflamatória, antibacteriana e anticancerígena (Duthie, 2007; Neto, 2007; Zafra-Stone *et al.*, 2007). A quantidade de compostos bioativos presentes nos mirtilos depende, não só, de fatores genéticos como também de fatores ambientais. Desta forma, as atividades biológicas destes frutos podem variar consoante as características de solo e de clima da região em que são produzidos. Assim, este trabalho teve por objetivo determinar a atividade antioxidante e antimutagénica das seis cultivares de mirtilos do grupo “Southern Highbush”, produzidas em modo de cultivo biológico, no Sul de Portugal, tentando avaliar a existência de diferenças significativas entre as cultivares resultantes dos seus diferentes génotipos. A capacidade antioxidante foi avaliada através de diferentes ensaios, nomeadamente, ensaios de avaliação da capacidade redutora, da capacidade para sequestrar várias espécies reativas de oxigénio e a ainda da capacidade de quelação de ferro. O potencial antimutagénico foi avaliado através do estudo da capacidade destas variedades para inibirem a mutagenicidade do mutagénico oxidativo *tert*-butil-hidroperóxido (t-BHP). Tentou-se ainda estabelecer uma correlação entre o conteúdo em compostos fenólicos, em particular em antocianinas, e a atividade antioxidante e antimutagénica das diferentes variedades.

A presente dissertação inicia-se com dois capítulos teóricos. No primeiro capítulo é efetuada uma breve caracterização do fruto do mirtilo, nomeadamente quanto às suas características gerais, diversidade genética, cultivo e produção em Portugal, fatores de qualidade, composição química, valor nutricional e propriedades funcionais. O segundo capítulo consiste numa revisão bibliográfica acerca das espécies reativas de oxigénio e dos mecanismos de defesa celular, efetuando-se uma breve caracterização de alguns antioxidantes e sua

biodisponibilidade. É ainda incluído um sub-capítulo sobre mutagêneos e antimutagêneos que podem ser veiculados através da alimentação.

No capítulo três são caracterizadas as amostras estudadas e descritos os procedimentos experimentais seguidos. Os resultados e discussão são apresentados no capítulo quatro e, por fim, no capítulo cinco são apresentadas as principais conclusões retiradas deste trabalho, bem como as perspectivas para a sua continuação.

1. O mirtilo

O mirtilo (*Vaccinium spp*) é uma espécie frutífera pertencente à família *Ericaceae*, subfamília *Vaccinoideae* e género *Vaccinium*, é nativo da América do Norte, Estados Unidos e Canadá, onde é denominado “blueberry” (Silva *et al.*, 2008). Na Europa a planta encontra-se nas regiões Norte e Centro, distribuindo-se desde a Islândia até Portugal e Espanha, estendendo-se da Itália e Macedónia à região do Cáucaso (Ritchie, 1956).

Em Portugal as plantas nativas, *V. myrtillus*, restrito à Serra do Gerês e o *V. vitis-idae* com uma distribuição, provavelmente, semelhante (Fonseca e Oliveira, 2007) encontram-se nas regiões de floresta, matos e pinhais de montanha entre 400 a 2500 metros de altitude (Lavadinho *et al.*, 2001). Na Ilha da Madeira é endémico o *V. padifolium*, cujos frutos com cerca de um centímetro de diâmetro são comestíveis e já foram, em tempos, exportados. Nos Açores encontra-se o *V. cylindraceum*, espécie não comestível mas protegida (Fonseca e Oliveira, 2007).

As plantas do género *Vaccinium* apresentam uma grande disparidade de aspeto e dimensões (Fonseca e Oliveira, 2007) sendo, no entanto, a maioria, arbustos de pequeno porte. A produção máxima atinge o seu auge depois dos seis ou sete anos de idade.

O fruto amadurece dois a três meses após a floração, é baciforme e globoso, de formato achatado (Sousa *et al.*, 2007), com diâmetro entre 8 e 22 mm (Antunes *et al.*, 2008) e com aproximadamente 1,5 a 4 g de peso (Figura 1.1). Quando maduro adquire coloração azul arroxeada, é sumarento e tem sabor doce-ácido (Silveira *et al.*, 2007). A baga apresenta no interior muitas sementes que contribuem para um sabor menos acentuado e conferem um certo grau de arenosidade. A cicatriz, pela sua dimensão, configuração e profundidade, pode ser um foco de contaminação, provocando perdas de humidade consideráveis e emurchecimento que conduzem a depreciação da qualidade pós-colheita (Sousa *et al.*, 2007).



Figura 1.1- Aspeto do fruto do mirtilo, *Vaccinium spp.*

Os mirtilos destinados à comercialização em fresco devem apresentar-se com cor azul e recobertos por uma cera epicuticular natural, a pruína, que constitui uma barreira importante à perda de água, impedindo o seu emurchecimento. A remoção da pruína é indicação de sobrematuração ou deficiente manuseamento durante a colheita e/ou pós-colheita (Sousa *et al.*, 2007). A dureza do epicarpo pode variar de acordo com a espécie, indicando diferenças na espessura e composição da parede celular (Silva *et al.*, 2005).

O mirtilo é um fruto não-climatérico, não se observando variações significativas na taxa respiratória ao longo do tempo de colheita e conservação (Lavadinho *et al.*, 2001).

Com o constante aumento do consumo de mirtilos frescos que se verificou nas últimas duas décadas, desenvolveram-se novas cultivares de forma a obter frutos de melhor qualidade, com maior tempo de prateleira e que prolonguem a época de colheita para dar resposta às solicitações do mercado (Saftner *et al.*, 2008).

1.1. Diversidade genética no Género *Vaccinium*

O género *Vaccinium* inclui aproximadamente 400 espécies. No entanto, existem apenas sete categorias de cultivares, nomeadamente “Lingongerry” (*V. vitis-idaea* L.), “Cranberry” (*V. oxycoccus* L.) e cinco grupos “Cyanococcus”: “Lowbush” (*V. angustifolium* Ait.), “Rabbiteye” (*V. ashei* Reade), “Half-high” (híbridos de *V. angustifolium* e *V. corymbosum*), “Northern Highbush” (*V. corymbosum* L.), e “Southern Highbush” (híbridos interespecíficos de *V. corymbosum* L.) (Galletta e Ballington, 1996).

As cultivares em estudo neste trabalho pertencem ao grupo “Southern Highbush”, originário da região Sul dos Estados Unidos, predominando a espécie *V. corymbosum* L. São também conhecidos como “Highbush” de baixa exigência em frio, requerendo entre 200 a 600 horas com temperaturas abaixo de 7,2 °C (Galletta e Ballington, 1996; Bremer *et al.*, 2008). Se o total de horas de frio for insuficiente para as necessidades das cultivares, pode ter-se uma floração deficiente e, conseqüentemente, uma reduzida produção (Antunes *et al.*, 2008). Na tabela 1.1 estão indicadas a origem, o número de horas de frio requeridas e algumas características das cultivares do grupo “Southern Highbush”. As principais cultivares deste grupo foram desenvolvidas através de hibridações entre *V. corymbosum*, *V. darrowi* e *V. ashei*. Correspondem a arbustos de porte alto (Galletta e Ballington, 1996) que apresentam produção de frutos mais precoce em relação aos outros grupos (Pagot, 2006), têm elevada produtividade e produzem frutos de elevada qualidade comercial (Bremer *et al.*, 2008), bagas de grande

tamanho (Lyrene e Williamson, 1997) com coloração azul intensa, firmeza e sabor ácido agradável (Kader *et al.*, 1996).

Tabela 1.1- Algumas características das cultivares do grupo “Southern Highbush”, adaptado de Lyrene e Williamson (1997).

Variedade	Origem / ano	Horas de frio requeridas	Abundância de Floração	Tamanho da baga
Sharpblue	FL / 1976	200	Média	Grande
Star	FL / 1995	400	Baixa	Muito grande
Misty	FL / 1990	300	Muito alta	Grande
O’Neal	NC / 1987	500	Baixa	Grande
Georgia Gem	GA / 1987	500	Baixa	Grande
Jubilee	MS / 1994	500	Média	Grande

FL – Florida; NC – Carolina do Norte; GA – Georgia; MS – Mississippi

1.2. Produção de mirtilos em Portugal

Portugal, devido às suas condições climáticas, apresenta um elevado potencial para a cultura do mirtilo. Atualmente são utilizados híbridos que permitem uma melhor adaptação das cultivares a vários níveis geográficos (Lavadinho *et al.*, 2001).

Em Portugal os primeiros ensaios para o cultivo de pequenos frutos começaram em 1985; a Mirtilusa – Sociedade de produtores hortofrutícolas, Lda., em Sever do Vouga, cultiva e comercializa mirtilos desde 1994. O nosso país apresenta uma diversidade de condições climáticas e pedológicas que permitem a cultura de pequenos frutos ao ar livre, em especial no Algarve, Alentejo e Oeste, sendo possível a cultura protegida para produção fora de época ao longo do outono, inverno e primavera. O cultivo de mirtilos em Portugal faz-se principalmente no litoral alentejano e na zona do médio Vouga. A produção estende-se de março a dezembro no litoral alentejano e a produção ao ar livre é possível entre maio e setembro em quase todas as regiões (Observatório dos Mercados Agrícolas e das Importações Agroalimentares, 2010).

Os grupos que apresentam maior interesse para as condições climáticas de Portugal são os “Northern Highbush”, “Southern Highbush” e, eventualmente, algumas cultivares do grupo “Rabbiteye”. Na zona Centro/Norte as cultivares que apresentam melhor desempenho pertencem principalmente ao grupo “Northern Highbush”, ao passo que, a Sul do Tejo, têm-se

revelado interessantes os híbridos dos grupos “Southern Highbush” e “Rabbiteye”, por necessitarem de menos horas de frio (Sousa *et al.*, 2007).

A produção nacional é estimada em 400 toneladas/ano. Cerca de 95% da produção, tanto em fresco como congelada, destina-se ao mercado externo, quase exclusivamente à União Europeia, e apenas 5% ao mercado interno. Atualmente o maior produtor de mirtilos em Portugal é a empresa Mirtisul, situada em Grândola, Setúbal (Observatório dos Mercados Agrícolas e das Importações Agroalimentares, 2010).

1.3. O cultivo do mirtilo

As plantas da família *Ericaceae* exigem solos com características específicas, preferencialmente solos ácidos (pH 4,5 a 5,5), com boa drenagem e grande retenção de água. Podem ser cultivadas em solos arenosos, franco-arenosos ou argilosos, desde que plantadas em substratos orgânicos, introduzidos por meio de coberturas vegetais incorporadas no solo, e irrigadas com água acidificada. Os arbustos têm exigências nutricionais específicas sendo o azoto, na forma de NH_4^+ , o componente base do fertilizante (Ochmian *et al.*, 2009). Os níveis de azoto foliar em mirtilos de cultivo biológico são mantidos entre os 1,6 e 2,2%, este nutriente natural promove a multiplicação de microrganismos benéficos do solo, sem alterar negativamente as associações simbióticas entre o sistema radicular da planta e determinados fungos do solo (Wang *et al.*, 2008), cujas hifas se expandem nas primeiras camadas de células das raízes e no solo que as rodeia, assumindo o papel de pelos radiculares ausentes na planta (Fonseca e Oliveira, 2007).

As ervas daninhas constituem um problema na produção comercial de mirtilos. No cultivo tradicional são utilizados herbicidas, em contraste, no cultivo biológico não são utilizados herbicidas sintéticos utilizando-se, ao invés, práticas de horticultura que incluem cobertura do substrato e mondas mecânica e manual. Herbicidas orgânicos, como alguns óleos e vinagre, são também utilizados. No cultivo tradicional as pragas e doenças são controladas com o uso de inseticidas e fungicidas sintéticos, na cultura biológica estes produtos não são permitidos, tomando-se medidas preventivas com a utilização de determinados minerais e espécies botânicas (Wang *et al.*, 2008).

A procura de alimentos de cultivo biológico tem aumentado nos últimos anos, especialmente por serem associados a alimentos mais saudáveis, de maior riqueza nutricional, mais saborosos e mais amigos do ambiente, quando comparados com os mesmos de cultivo tradicional (Wang *et al.*, 2008).

1.4. Fatores de qualidade do fruto

O consumidor procura produtos de qualidade, avaliando principalmente a aparência exterior (tamanho, forma, humidade, ausência de defeitos, sanidade), parâmetros relacionados com o grau de maturação (aroma, sabor, cor e textura) e o valor nutricional, sendo o grau de maturação no momento da colheita determinante para a qualidade do fruto (Kader, 1996; Sousa *et al.*, 2007). Nos mirtilos destinados ao consumo em fresco, a firmeza da polpa determina a sua aceitabilidade pelo consumidor e afeta o seu período de conservação pós-colheita (Molina *et al.*, 2008). Celulose, hemicelulose, pectina e lenhina são os principais constituintes da parede celular do fruto. Alterações na composição da parede celular e da lamela média do fruto, constituídas principalmente por pectina, são associadas a alterações da textura. A solubilização da pectina é frequentemente correlacionada com a perda de firmeza. Por outro lado, a lenhina é responsável pela rigidez e dureza da parede celular das células pétreas, as quais, dependendo do seu número e tamanho, conferem ao fruto uma textura arenosa. A quantidade de lenhina presente é uma característica da cultivar (Silva *et al.*, 2005).

A cor é um importante parâmetro de qualidade, influenciando o valor de mercado do fruto destinado ao consumo em fresco, mas também determina a conformidade dos mirtilos destinados a processamento. No entanto, a cor é um atributo complexo, determinado pelo teor total em antocianinas e pela quantidade e estrutura da cera superficial, a pruína (Silva *et al.*, 2005).

Fatores genéticos, que variam com as cultivares, práticas de cultivo (densidade de plantação, fertilização, irrigação e tratamentos antipragas), condições climáticas, grau de maturação na data de colheita e método de colheita influenciam a composição química e a qualidade do fruto (Skupień, 2006). A subsequente conservação da sua qualidade depende das condições de armazenamento, principalmente da temperatura e da humidade relativa (Kader, 1996).

1.5. Composição química e valor nutricional

Os mirtilos têm baixo conteúdo em fibra, baixo valor calórico (Skupień, 2006), baixo teor em gordura e em sódio (Silveira *et al.*, 2007) e um conteúdo em água que varia entre 80,1 e 87,7% (Skupień, 2006). Apresentam uma grande variedade de vitaminas (A, B, C, K e ácido fólico) e minerais (potássio, magnésio, cálcio, fósforo, ferro e manganésio), açúcares, pectinas, taninos, ácidos orgânicos e resveratrol (Silveira *et al.*, 2007). O teor de fibras e azoto do fruto é fortemente condicionado pela fertilização da planta e parcialmente por fatores genéticos, bioquímicos e fisiológicos da cultivar (Skupień, 2006).

De acordo com Bremer e colaboradores (2008), nas cultivares do grupo “Southern Highbush” os açúcares frutose e glucose são predominantes, enquanto a sacarose tem um teor muito baixo. O ácido cítrico é o ácido orgânico mais abundante, em média cerca de 83% do total, seguindo-se o succínico com cerca de 11%, o málico e o quínico com cerca de 2% e 5%, respectivamente (Wang *et al.*, 2008). O teor em sólidos solúveis no fruto, assim como a sua acidez, registam variações sazonais (Skupień, 2006) e parecem ser dependentes das técnicas de cultivo. Assim, Wang e colaboradores (2008) obtiveram maiores teores de açúcar (glucose e frutose) e de ácido málico em mirtilos de cultivo biológico do que em mirtilos de cultivo tradicional. No entanto, o método de cultivo não mostrou afetar a concentração de ácido cítrico. Na tabela 1.2 indica-se a composição química média de frutos de mirtilo, por 100 g de parte edível, de acordo com a base de dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA, 2010).

Tabela 1.2- Composição química média de frutos de mirtilo do género *Vaccinium* (grupos “Highbush” (*V. corymbosum* e *V. ashei*) e “Lowbush” (*V. angustifolium*)) por 100 g de parte edível (USDA , 2010).

Nutrientes		Valor/100g de parte edível
Valor calórico		57 Kcal
Proteínas		0,74 g
Lípidos totais		0,33 g
Açúcares totais		9,96 g
Sacarose		0,11 g
Glucose (dextrose)		4,88 g
Frutose		4,97 g
Amido		0,03 g
Fibras		2,40 g
Cinzas		0,24 g
Água		84,21 g
Minerais	Cálcio, Ca	6,00 mg
	Ferro, Fe	0,28 mg
	Magnésio, Mg	6,00 mg
	Fósforo, P	12,00 mg
	Potássio, K	77,00 mg
	Sódio, Na	1,00 mg
	Zinco, Zn	0,16 mg
	Cobre, Cu	0,057 mg
	Manganésio, Mn	0,336 mg
	Selénio, Se	0,10 µg
Vitaminas	Vitamina C	9,70 mg
	Tiamina	0,037 mg
	Riboflavina	0,041 mg
	Niacina	0,418 mg
	Ácido pantoténico	0,124 mg
	Vitamina B6	0,052 mg
	Folato	6,00 mg
	Vitamina A (vitamina e provitamina)	54,00 IU
	Vitamina E	0,57 mg
Pigmentos	Luteína + zeaxantina	80,00 µg

Para além dos compostos referidos na Tabela 1.2, têm ainda sido identificados, tanto nos mirtilos selvagens, como nos mirtilos cultivados, diversos compostos fenólicos, apresentando, de um modo geral, os mirtilos selvagens, teores em polifenóis, em particular em antocianinas, mais elevados do que as variedades cultivadas (Giovanelli e Buratti, 2009). Dos diversos tipos de polifenóis, os mirtilos apresentam elevadas quantidades de antocianinas, principalmente na sua forma glicosilada (cianidina, malvidina, delphinidina, etc.), flavonóis (quercetina, canferol, miricetina, etc.), flavanóis (catequina, epicatequina, etc.), ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos, (principalmente ácido clorogénico), estilbenos (resveratrol e piceatanol) e taninos condensados (Zheng e Wang, 2003; Neto, 2007; Wang *et al.*, 2008; Giovanelli e Buratti, 2009). No entanto, o perfil exato destes compostos, bem como a quantidade em que se encontram, variam, não só, com a cultivar, como também com aspetos climáticos e com o local de cultivo, podendo algumas destas diferenças ser resultado de diferentes graus de “stress” hídrico, da maior ou menor disponibilidade de nutrientes e da intensidade da radiação ultravioleta (Giovanelli e Buratti, 2009).

A Tabela 1.3 indica o teor de alguns polifenóis, em particular dos pertencentes ao grupo dos flavonoides, encontrados em mirtilos.

Tabela 1.3 - Teor de antocianinas, flavanóis e flavonóis de frutos de mirtilo do género *Vaccinium* (grupos “Highbush” (*V. corymbosum* e *V. ashei*) e “Lowbush” (*V. angustifolium*)) por 100 g de parte edível (USDA, 2010).

Subclasse	Flavonoides	Valor (mg)	Valor mínimo (mg)	Valor máximo (mg)
Antocianinas	Cianidina	15,02	4,79	28,72
	Delfinidina	29,54	20,82	47,37
	Malvidina	49,21	32,95	69,44
	Peonidina	7,05	1,01	19,37
	Petunidina	11,73	7,19	18,25
Flavanóis	Epicatequina	1,11	1,11	1,11
Flavonóis	Miricetina	0,82	0	2,60
	Quercetina	3,11	1,70	7,30

Tem, igualmente, sido identificada, em diversas variedades de mirtilos, a presença de ácido ursólico e de ácido pomólico (especialmente na película do fruto) e de outros triterpenos, como a β -amirina, e ainda de esteroides como o sitosterol (Neto, 2007).

1.6. Propriedades funcionais dos mirtilos

Os mirtilos são reconhecidamente uma fonte muito rica de antioxidantes (Sellappan *et al.*, 2002), de entre os frutos e vegetais, são dos que apresentam maior capacidade para sequestrar o radical peróxido, medida através do ensaio ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) (Neto, 2007). Estudos realizados com voluntários humanos mostraram que o consumo de mirtilos levava a um aumento da capacidade antioxidante do plasma, (revisto em Neto, 2007). Smith e colaboradores (2000), utilizando tirosina, como modelo da oxidação de proteínas, ou ácido linoleico, como modelo da oxidação de lípidos, verificaram que os extratos de mirtilo apresentaram capacidade de inibir a oxidação destas moléculas quando em presença de radicais de oxigénio.

A atividade antioxidante dos mirtilos deve-se ao seu elevado teor em compostos fenólicos, sendo que, a contribuição individual de cada um desses compostos para a capacidade antioxidante total, está geralmente dependente da estrutura de cada um desses compostos bem como da concentração em que estes se encontram (Zheng e Wang, 2003). De acordo com Giovanelli e Buratti (2009), a atividade antioxidante dos mirtilos parece estar mais diretamente correlacionada com a concentração de fenóis totais do que apenas com a sua concentração em antocianinas, embora estas também contribuam para as propriedades antioxidantes dos mirtilos (Zheng e Wang, 2003). Os polifenóis presentes nos mirtilos demonstraram conferir proteção significativa contra radicais livres e “stress” oxidativo em glóbulos vermelhos *in vivo* (Zafra-Stone *et al.*, 2007), podendo levar a uma diminuição dos efeitos do “stress” oxidativo e de estados inflamatórios do sistema vascular (Neto, 2007).

Muitas das propriedades biológicas benéficas dos mirtilos podem, de algum modo, estar relacionadas com a presença de antocianinas, flavonoides e de outros compostos fenólicos, podendo, estes efeitos benéficos resultar da ação de compostos isolados, de grupos específicos de compostos ou de efeitos de sinergia entre vários destes compostos (Neto, 2007). Os compostos fenólicos antioxidantes dos mirtilos desempenham um papel importante na inibição da progressão das doenças cardiovasculares, incluindo aterosclerose, e de algumas doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento (Neto, 2007). Uma destas substâncias, a quercetina, parece desempenhar um papel protetor contra doenças cardiovasculares e tem sido associada a efeitos preventivos contra determinados tipos de tumores (Smith *et al.*, 2000), incluindo cancro de mama, cólon, pâncreas e leucemia (Neto, 2007). Os mirtilos contêm pterostilbeno, substância que, em ensaios em animais de laboratório, se mostrou eficaz na diminuição dos níveis de lipoproteínas e de colesterol no sangue. Um dos possíveis mecanismos que leva a este efeito envolve a ligação desta molécula aos ácidos biliares com uma consequente estimulação da sua excreção, da mesma forma que as fibras alimentares e outros fitonutrientes

contribuem para baixar os níveis de colesterol por estimularem a excreção de ácidos biliares e, consequentemente, estimularem a sua síntese hepática a partir do colesterol (Neto, 2007).

Os extratos de mirtilo são utilizados na produção de centenas de produtos farmacêuticos e as antocianinas neles presentes são, há muito, utilizadas no melhoramento da acuidade visual (Burdulis *et al.*, 2007). Dentro dos benefícios para a visão que são atribuídos aos mirtilos encontram-se o melhoramento da visão noturna, o aumento da circulação sanguínea ao nível da retina, a redução da degeneração macular, a redução da retinopatia diabética e prevenção de glaucoma, retinite pigmentosa e cataratas. Estes benefícios parecem estar associados não só com os compostos fenólicos, em particular com as antocianinas, mas também com os carotenoides presentes nas espécies *Vaccinium* (Zafra-Stone *et al.*, 2007).

A expressão de genes inflamatórios em ratos alimentados com extratos de mirtilo foi diminuída, sugerindo a presença nestes extratos de compostos capazes de desencadear uma resposta antiinflamatória. Os extratos de mirtilo foram, igualmente, eficazes na inibição de promotores tumorais (Stull *et al.*, 2010) e na proteção de células cerebrais contra “stress” oxidativo (Neto, 2007). Segundo Carlsen e colaboradores (2003), ratos alimentados com extratos de mirtilos aumentaram as defesas antioxidantes do cérebro e músculo-esquelético, retardando os efeitos do envelhecimento e melhorando as funções cognitivas. Os extratos aumentam a libertação de dopamina no cérebro, a qual melhora os processos de comunicação entre os neurónios (Zafra-Stone *et al.*, 2007). O efeito protetor dos extratos sobre a musculatura esquelética parece ser relevante dado que alguns estudos demonstraram o aumento do “stress” oxidativo no tecido muscular após exercício físico exaustivo (Carlsen *et al.*, 2003). As folhas e frutos de mirtilo são utilizados no tratamento da diabetes. A administração de um extrato de folhas de *V. myrtillus* a ratos diabéticos reduziu em 26% os níveis de glucose no sangue (Zafra-Stone *et al.*, 2007), enquanto que o consumo de mirtilos levou a uma melhoria da sensibilidade à insulina em voluntários humanos, obesos, não diabéticos mas com resistência à insulina (Stull *et al.*, 2010).

Alguns trabalhos mostram a existência nos mirtilos de compostos com atividade antibacteriana. O sumo de mirtilo contém taninos condensados, principalmente proantocianidinas, que se têm revelado eficazes no tratamento de infeções do trato urinário (Wang e Stretch, 2001), ao inibirem a aderência das bactérias por elas responsáveis (Smith *et al.*, 2000). Os extratos de mirtilo conseguiram inibir, *in vitro*, o crescimento da bactéria *Helicobacter pylori*, conhecida como um fator de risco associado ao surgimento de algumas doenças gastrointestinais, incluindo úlcera duodenal e cancro de estômago (Zafra-Stone *et al.*, 2007).

Ensaios *in vitro* mostraram que o sumo de mirtilo consegue inibir a mutagénese causada pelo agente alquilante e cancerígeno metilmetanossulfonato e pelo pré-cancerígeno benzo(a)pireno, bem como reduzir a proliferação de linhas celulares tumorais de mama (MCF-7) e cólon (HT29) (Duthie, 2007), enquanto que o ácido ursólico e os seus derivados, ácido pomólico e β -amirina, compostos cuja presença já foi identificada nestes frutos, se mostraram capazes de inibir a proliferação e síntese de DNA em células leucémicas HL-60 e de inibir o crescimento de células HCT 116 de carcinoma do cólon (Neto, 2007).

O mecanismo de atuação dos extratos de mirtilo na atividade anticancerígena não está ainda totalmente esclarecido, pensando-se que a sua capacidade de inibição de tumores resulte de uma sinergia entre os vários fitoquímicos presentes no fruto, incluindo flavonóis (principalmente a quercetina), proantocianidinas, antocianinas, resveratrol, pterostilbeno, piceatanol e ácido ursólico. Alguns estudos realizados *in vitro* sugerem que o mecanismo de ação incluía, entre outros, a indução de apoptose em células neoplásicas, redução da formação de metástases pela inibição de metaloproteínas, inibição da atividade da enzima ornitina descarboxilase (responsável pela síntese de poliaminas que favorecem a proliferação celular), inibição de angiogénese (formação/crescimento de novos vasos sanguíneos), inibição de processos inflamatórios ou indução de enzimas, direta ou indiretamente, envolvidas na destoxificação de vários cancerígenos como, por exemplo, a γ -glutamylcisteina sintetase, envolvida na biossíntese da glutathione, ou a quinona redutase, que converte as quinonas em hidroquinonas, quebrando desta forma os ciclos redox, responsáveis pela formação de espécies reativas de oxigénio (Ferrari e Torres, 2002; Carlsen *et al.*, 2003; Cuendet *et al.*, 2006; Neto, 2007).

2. Antioxidantes e Antimutagêneos Alimentares

2.1. Espécies reativas de oxigênio (ROS) e sua ação biológica

Um radical livre é uma espécie química que contém um ou mais elétrons desemparelhados. Essas espécies atuam como aceitadores de elétrons de outras moléculas originando a sua oxidação. Os radicais livres, e moléculas com estes relacionados, são classificados como espécies reativas de oxigênio (ROS) devido à sua capacidade de causar danos oxidativos na célula (Migliore e Coppedè, 2009).

A cadeia respiratória mitocondrial constitui a principal fonte endógena de formação de ROS, estimando-se que a maioria (95 a 98%) das ROS produzidas durante o metabolismo aeróbio derive deste processo (Migliore e Coppedè, 2009). No entanto, as ROS podem, igualmente, formar-se no decurso de outros processos metabólicos celulares, tais como, por exemplo, os que envolvem a atuação das enzimas, NADPH oxidase, xantina oxidase, ciclo-oxigenases, lipoxigenases ou monoxigenases como os citocromos P450 (Valko *et al.*, 2006; Al-Gubory *et al.*, 2010). Há ainda fatores ambientais que podem induzir a produção de ROS. Nestes incluem-se a radiação ionizante, a exposição ambiental a metais e compostos metalóides como, por exemplo, cádmio, crómio e níquel, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, dióxido de enxofre, pesticidas como o paraquat e substâncias do fumo do tabaco (Migliore e Coppedè, 2009).

As ROS desempenham papéis fisiológicos importantes ao funcionarem como mensageiros secundários nas células de mamíferos, regulando vias de transdução de sinal, que controlam a expressão de genes e a indução de alterações pós-traducionais de proteínas, estando, assim, implicadas no controlo dos processos de divisão e diferenciação celular (Al-Gubory *et al.*, 2010). No entanto, a geração excessiva de ROS, induzida por vários estímulos que excedem a capacidade antioxidante endógena do organismo, origina modificações oxidativas nas membranas celulares e em biomoléculas (Gülçin, 2006a) levando a patologias no ser humano tais como artrites, aterosclerose, cirrose enfisema e cancro (Gülçin *et al.*, 2002). Desta forma, o equilíbrio entre oxidação e antioxidação torna-se fundamental para a manutenção da saúde dos sistemas biológicos (Dudonné *et al.*, 2009).

Os organismos vivos encontram-se normalmente numa situação de equilíbrio entre o seu potencial pró-oxidante e antioxidante. Uma alteração desse equilíbrio em favor do potencial oxidante designa-se por “stress” oxidativo. O “stress” oxidativo pode resultar de uma depleção de antioxidantes, devida a uma nutrição deficiente ou a uma produção em excesso de espécies

reativas de oxigénio, tanto de origem endógena como exógena. A exposição a condições de “stress” oxidativo suaves conduz, geralmente, a um aumento da síntese dos sistemas de defesa antioxidante, com o objetivo final de repor o equilíbrio. Por outro lado, a exposição a condições de “stress” oxidativo mais severas conduz a uma acumulação de lesões oxidativas, com implicações fisiopatológicas.

As ROS reagem com muitas biomoléculas incluindo proteínas, lípidos, lipoproteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA) (Nordberg e Arnér, 2001), havendo fortes evidências que também o ácido ribonucleico (RNA) sofra danos oxidativos (Migliore e Coppedè, 2009). Podem facilmente iniciar a peroxidação das membranas biológicas, levando à acumulação de peróxidos lipídicos (Gülçin, 2006a), podem induzir uma série de respostas celulares que vão desde a estimulação das taxas de mitose à apoptose e necrose (Cadenas e Davies, 2000), contribuem para o envelhecimento celular, mutagénese, carcinogénese, doenças cardíacas (Heim *et al.*, 2002) e doenças degenerativas como as doenças de Alzheimer, Parkinson, Huntington e esclerose lateral amiotrófica (Migliore e Coppedè, 2009).

Todos os componentes celulares são suscetíveis de sofrer a ação das ROS porém, as biomembranas são das estruturas mais atingidas devido à ocorrência da peroxidação lipídica que acarreta alterações na sua estrutura e permeabilidade (Ferreira e Matsubara, 1997; Deaton e Marlin, 2003). Consequentemente, há perda da seletividade nas trocas iónicas e libertação do conteúdo de organitos celulares originando a formação de produtos citotóxicos e morte celular (Ferreira e Matsubara, 1997). O processo de lipoperoxidação pode resultar ainda na formação de aldeídos, como o malonildialdeído ou o 4 – hidroxinonenal, que podem migrar do local onde foram produzidos e causar lesões noutros constituintes celulares como, por exemplo, as proteínas ou o DNA. A interação entre as ROS e as proteínas pode resultar em alterações estruturais e, nalguns casos, na alteração da sua atividade enzimática (Deaton e Marlin, 2003).

O cérebro é um dos tecidos mais suscetíveis ao “stress” oxidativo devido ao seu elevado consumo de oxigénio e, consequentemente, à elevada geração de ROS. Além disso, quando comparado com outros tecidos, no cérebro as enzimas antioxidantes, como a glutathione peroxidase e a catalase, apresentam atividade mais baixa, há elevada concentração de ácidos gordos poliinsaturados muito suscetíveis à peroxidação lipídica e elevadas quantidades de iões metálicos, tais como o ferro, que atuam como catalisadores das reações geradoras das ROS, contribuindo para que os danos oxidativos sejam mais acentuados (Migliore e Coppedè, 2009).

As ROS incluem espécies químicas derivadas do oxigénio tais como peróxido de hidrogénio (H_2O_2), oxigénio singleto (1O_2) (forma excitada do oxigénio molecular), radical anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical peróxilo (HOO^{\bullet}) ou o radical hidroxilo (OH^{\bullet}) (Cadenas e Davies, 2000).

O oxigénio molecular, quando no estado fundamental, designado por oxigénio tripleto, possui dois eletrões desemparelhados com “spins” paralelos, em duas orbitais separadas. Esta molécula, que no estado fundamental é pouco reativa, pode no estado excitado originar espécies de reatividade bem mais acentuada como são o oxigénio singlete delta, em que os dois eletrões de valência ocupam a mesmo orbital e têm sentidos opostos, e o oxigénio singlete sigma, em que os dois eletrões de valência ocupam orbitais diferentes tendo “spins” antiparalelos. Esta ativação do oxigénio pode ocorrer nos alimentos e na pele através de reações de fotossensitização, podendo igualmente ocorrer na retina mediante interações entre a luz visível e o oxigénio. A formação do oxigénio singlete ao nível dos olhos poderá desencadear o aparecimento de cataratas (Halliwell *et al.*, 1995).

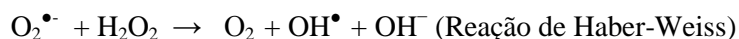
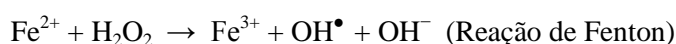
O radical anião superóxido ($O_2^{\bullet -}$) é produzido por vários sistemas enzimáticos em reações de auto-oxidação e por reações não enzimáticas, por transferência de eletrões, que reduzem o oxigénio molecular (Gülçin, 2006b). A sua produção *in vivo* é essencial para a defesa do organismo e para a transferência de sinais entre células vivas, no entanto, a sua produção excessiva causa “stress” oxidativo (Alves *et al.*, 2010). Esta espécie química, pode converter-se noutras espécies reativas de oxigénio, como o radical hidroxilo, o peróxido de hidrogénio ou o radical peroxilo ($HO\bullet$), estando assim direta ou indiretamente envolvida em processos patológicos, que induzem danos oxidativos em lípidos, proteínas e DNA. Alguns flavonoides com propriedades antioxidantes são efetivos no sequestro destes radicais (Gülçin, 2006b).

O peróxido de hidrogénio, H_2O_2 , pode ser formado *in vivo* pela dismutação do radical anião superóxido ($O_2^{\bullet -}$) catalisada pela superóxido dismutase (SOD) (Alves *et al.*, 2010) ou por ação de muitas enzimas oxidativas como, por exemplo, os citocromos P450 ou a glicolato oxidase (Halliwell *et al.*, 1995; Magalhães *et al.*, 2008). Por não ser uma espécie radicalar, o peróxido de hidrogénio, é mais estável, tendo, por isso, um tempo de semivida mais longo, pode atravessar as membranas biológicas e oxidar inúmeras biomoléculas. Apesar de em si mesmo o peróxido de hidrogénio não ser muito reativo, origina toxicidade celular por dar origem a espécies mais reativas, especialmente por poder dar origem ao radical hidroxilo (Gülçin, 2006a). A produção de H_2O_2 durante a desaminação oxidativa das catecolaminas pode estar associada ao aparecimento de doenças neurodegenerativas como as doenças de Parkinson e de Alzheimer, presumivelmente por dano oxidativo da membrana mitocondrial (Cohen, 1999). O H_2O_2 é também responsável por danos oxidativos provocados no DNA mitocondrial (Cadenas e Davies, 2000). A toxicidade do peróxido de hidrogénio pode ser aumentada de dez para mil vezes na presença de iões ferro (Ferreira e Matsubara, 1997).

O radical hidroxilo é a mais reativa de todas as ROS nos sistemas biológicos (Heim *et al.*, 2002), apresentando um enorme potencial oxidativo, sendo capaz de reagir com quase todo o

tipo de moléculas encontradas na matriz dos alimentos e nas células vivas (Halliwell *et al.*, 1995), podendo “atacar” até compostos inertes, como alcanos, considerados estáveis em condições fisiológicas (Chobot, 2010). Este radical é o principal responsável pelos efeitos citotóxicos das ROS observados em todos os organismos aeróbios, desde as bactérias até ao Homem (Bektaşoğlu *et al.*, 2006), pode levar a danos celulares generalizados baseados na oxidação das membranas lipídicas, enzimas, proteínas estruturais e ácidos nucleicos (Cohen e Heikkila, 1974). Este radical é tão reativo, tendo por isso um tempo de semivida tão curto, que parece mais presumível, que os antioxidantes capazes de minimizar os danos por ele causados, não atuem diretamente no seu sequestro mas sim no bloqueio da sua formação, quer através do sequestro ou inibição da formação dos seus precursores (principalmente $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2), quer pela ligação aos iões de metais de transição implicados na sua geração (Halliwell *et al.*, 1995).

Os iões metálicos apresentam uma ação catalítica nas reações que levam a lesões oxidativas no organismo. O radical hidroxilo pode formar-se a partir do radical anião superóxido e do peróxido de hidrogénio através das reações de Fenton e de Haber-Weiss (Valko *et al.*, 2007):



Embora outros metais de transição como o cobre, crómio ou manganésio possam também catalisar a reação de Haber-Weiss (Chobot, 2010), o ferro é o metal mais abundante no organismo e está biologicamente mais capacitado para catalisar as reações de oxidação de biomoléculas (Ferreira e Matsubara, 1997). O ferro é considerado um importante pró-oxidante da oxidação dos lípidos devido à sua elevada reatividade (Gülçin, 2006a). No estado ferroso, acelera a oxidação lipídica e converte o peróxido de hidrogénio em radicais hidroxilo via reação de Fenton.

2.2. Mecanismos celulares de defesa antioxidante

Os níveis relativamente baixos de oxigénio nos tecidos (0,5 a 5%) ajudam a evitar as lesões oxidativas nas células (Barzilai e Yamamoto, 2004). No entanto, durante o processo evolutivo as células desenvolveram mecanismos de regulação complexos que incluem enzimas e metabolitos redutores que auxiliam a manutenção da homeostase redox. Consequentemente, os produtos naturais têm sido analisados na pesquisa da sua capacidade antioxidante e de propriedades sequestrantes das ROS (Chobot, 2010).

Um antioxidante pode ser definido como uma substância que, presente em baixas concentrações, quando comparado com a concentração do substrato oxidável, inibe ou atrasa significativamente a oxidação do substrato, protegendo os alvos biológicos (Halliwell *et al.*, 1995, Apak *et al.*, 2007). Este tipo de compostos é largamente utilizado na indústria alimentar como forma de prolongar o prazo de validade dos alimentos (Dudonné *et al.*, 2009), evitando, por exemplo, a sua rancificação (Halliwell *et al.*, 1995). Para além de prolongarem o tempo de prateleira dos alimentos, os antioxidantes naturais podem originar nutracêuticos que ajudem a prevenir os danos oxidativos que ocorrem no organismo humano (Dudonné *et al.*, 2009).

A importância relativa dos vários tipos de antioxidantes *in vivo* depende do tipo de ROS geradas, como são geradas e qual o alvo do dano. Assim, é possível que um antioxidante tenha efeitos protetores num sistema e seja ineficaz noutros. Por exemplo, antioxidantes inibidores da peroxidação lipídica podem não prevenir a oxidação de outros alvos, como sejam as proteínas ou o DNA, ou até, em alguns casos, potenciar esses danos (Halliwell *et al.*, 1995).

Os antioxidantes podem ser divididos em duas categorias, os enzimáticos, que são capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, são enzimas que removem as espécies reativas de oxigénio, e os não enzimáticos, que são moléculas que interagem com as ROS, ou com os compostos que intervêm na sua formação, sendo consumidas durante a reação (revisto em Ratnam *et al.*, 2006 e Angelo e Jorge, 2007). Exemplos destes antioxidantes não enzimáticos são macromoléculas como a albumina, ceruloplasmina e ferritina e moléculas mais pequenas como o ácido úrico, ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno e outros carotenoides, glutathione reduzida (Wang *et al.*, 1996), arginina, citrulina, taurina e creatina (Migliore e Coppédè, 2009) e ainda elementos minerais como o zinco e o selénio (Ratnam *et al.*, 2006) (Figura 2.1).

Os antioxidantes enzimáticos incluem a superóxido dismutase (SOD), catalase e a glutathione peroxidase (GPx). A SOD catalisa a dismutação do radical anião superóxido em oxigénio e peróxido de hidrogénio, enquanto que a catalase protege as células, ao catalisar a decomposição do peróxido de hidrogénio em oxigénio molecular e água, sem produzir radicais livres. A glutathione peroxidase é uma seleno-proteína que utiliza o peróxido de hidrogénio para oxidar a glutathione. Para além de remover o peróxido de hidrogénio, esta enzima, consegue ainda destruir os radicais hidroperóxido, formados nas reações de lipoperoxidação, convertendo-os em álcoois. Existem ainda outras glutathione peroxidases, não dependentes do selénio, capazes de catalisar esta última reação (Cotgreave *et al.*, 1988).

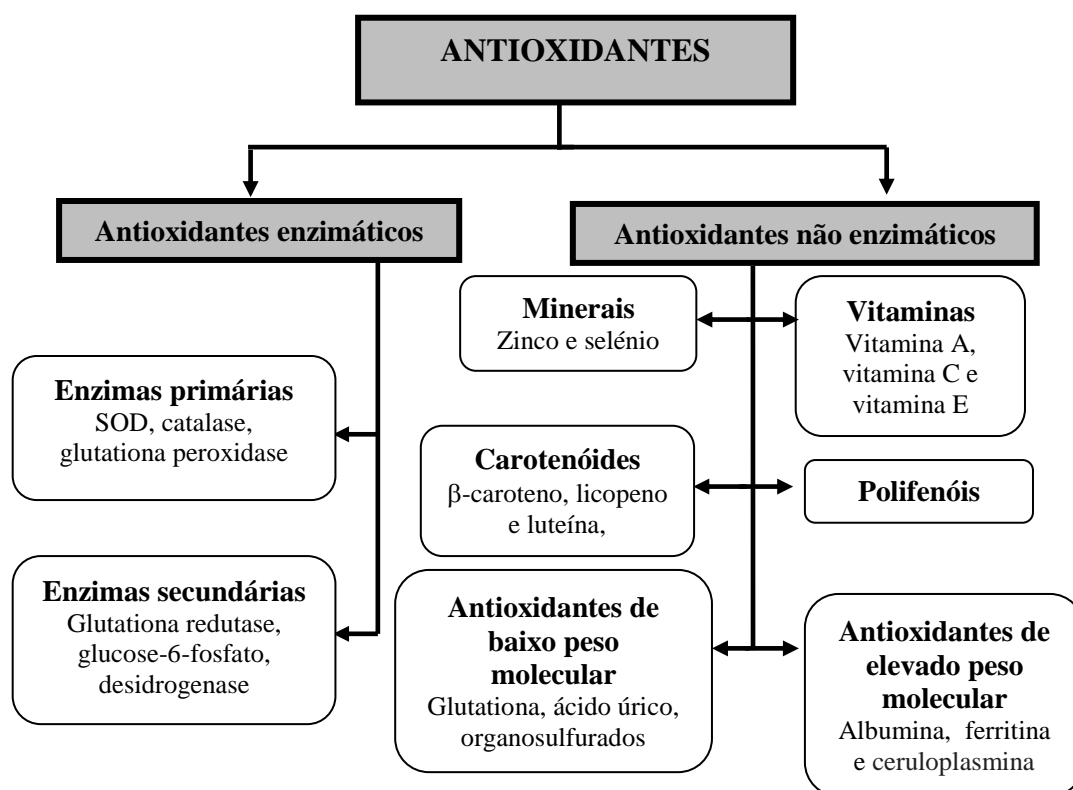


Figura 2.1 – Classificação de antioxidantes (adaptado de Ratnam *et al.*, 2006 e Wang *et al.*, 1996).

In vivo, os antioxidantes não enzimáticos podem atuar de diversas formas: elevando os níveis das enzimas antioxidantes, por exemplo, suprarregulando a expressão de genes que codificam para a SOD, catalase ou glutathiona peroxidase; sequestrando as espécies reativas de oxigénio, por mecanismos que podem envolver a transferência de um átomo de hidrogénio (HAT) ou por atividade redutora, isto é, por transferência de eletrões (SET) com produção de produtos de baixa reatividade; Capacidade de quelação de metais, em particular dos catiões de ferro envolvidos nas reações de Fenton; Inibição de enzimas oxidantes, ou seja enzimas que geram espécies reativas de oxigénio, como, por exemplo, a xantina oxidase ou as ciclooxigenases (Magalhães *et al.*, 2008). A inibição da geração de iões hidróxido pela ligação de iões metálicos pode ocorrer através de dois mecanismos: a ligação do antioxidante ao ião metálico pode alterar o seu potencial redox, impedindo-o de participar na formação desses iões, outra hipótese é que a ligação do metal de transição ao antioxidante não previna diretamente a reação redox, mas impeça que estas ocorram nos alvos biológicos mais importantes (Halliwell *et al.*, 1995).

A maioria dos antioxidantes não enzimáticos é obtida através da dieta (Ratnam *et al.*, 2006). Existe uma associação inversa entre o consumo de frutos e legumes e a mortalidade por doenças relacionadas com o envelhecimento, devendo-se isso, em parte, à presença de compostos com propriedades antioxidantes (Dudonné *et al.*, 2009). Os frutos contêm um conjunto de antioxidantes naturais que podem ter não só elevada capacidade antioxidante, mas também, constituir uma combinação ou mistura mais eficaz. O suplemento de um ou apenas alguns compostos antioxidantes pode não ser muito efetivo, uma dieta equilibrada e rica em frutos e vegetais pode ser muito mais eficaz na proteção do organismo contra danos oxidativos de diversas origens do que o suplemento de um único antioxidante como, por exemplo, vitamina C ou E (Wang *et al.*, 1996).

Os polifenóis presentes nos frutos e vegetais são, em grande parte, os compostos responsáveis pela sua capacidade antioxidante (Prior *et al.*, 1998). Com efeito, a capacidade antioxidante destes alimentos está, de um modo geral, fortemente correlacionada com o seu teor em polifenóis (Sellappan *et al.*, 2002, Giovanelli e Buratti, 2009). Estes compostos estimulam as defesas do organismo e protegem os constituintes celulares de danos oxidativos (Dudonné *et al.*, 2009). Uma vez que os processos oxidativos estão envolvidos no processo de envelhecimento, bem como, no surgimento de diversas patologias, como, por exemplo, doenças cardíacas, aterosclerose, cancro (Fukumoto e Mazza, 2000), os compostos antioxidantes, capazes de neutralizar as ROS, podem desempenhar um papel importantíssimo na prevenção destas doenças (Wang *et al.*, 1996).

2.3. Os polifenóis

Os polifenóis ou compostos fenólicos resultam do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento, reprodução e pigmentação. Formam-se também em resposta a condições de “stress” como, por exemplo, nos casos de infeções, ferimentos ou exposição acentuada à radiação ultravioleta. Nos alimentos, são muitas vezes responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa (Angelo e Jorge, 2007). São considerados compostos bioativos não nutrientes, o que os torna uma parte importante da dieta, estimando-se o seu consumo diário em 1 g/indivíduo (Carlsen *et al.*, 2003). Nos vegetais encontram-se na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) ou a proteínas (Angelo e Jorge, 2007).

Quimicamente, os polifenóis contêm, pelo menos, um anel aromático ao qual se ligam um ou vários grupos hidroxilo (OH) assim como outros grupos substituintes. Este grupo de compostos engloba desde moléculas simples até moléculas com elevado grau de polimerização e pode dividir-se em diferentes classes (Figura 2.2).

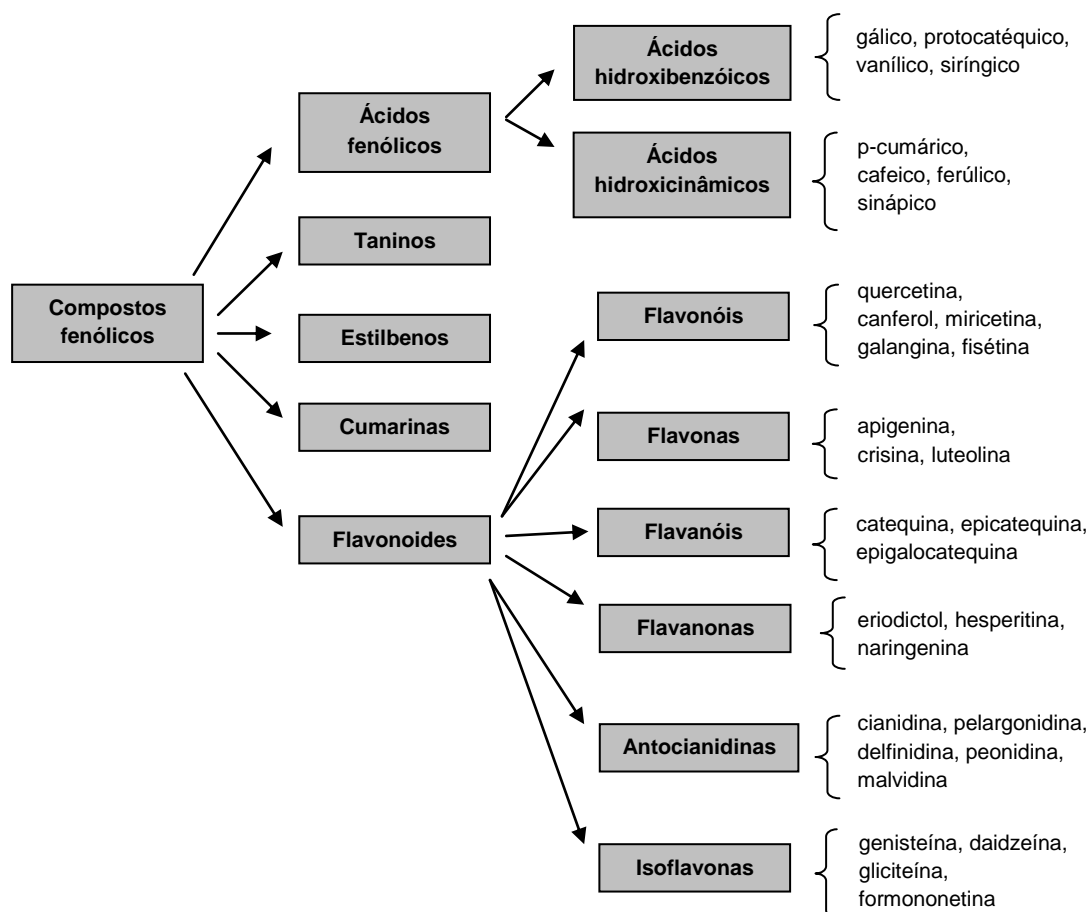


Figura 2.2- Principais classes de compostos fenólicos (Ferreira e Abreu, 2007).

Os polifenóis são distribuídos pelas diferentes classes de acordo com o seu esqueleto de átomos de carbono por exemplo: C6, fenóis simples como o resorcinol; C6-C1, ácidos fenólicos como o ácido gálico; C6-C3, ácidos hidroxicinâmicos como o ácido cafeico; C6-C4, hidroxiantraquinonas; C6-C2-C6, estilbenos como o resveratrol; C6-C3-C6, flavonoides como a quercetina; (C6-C3)₂, linhanas; (C6-C3-C6)₂, biflavonóides; (C6-C3)_n, lenhinas; (C6-C3-C6)_n, taninos condensados ou proantocianidinas (Figura 2.3) (Apak *et al.*, 2007).

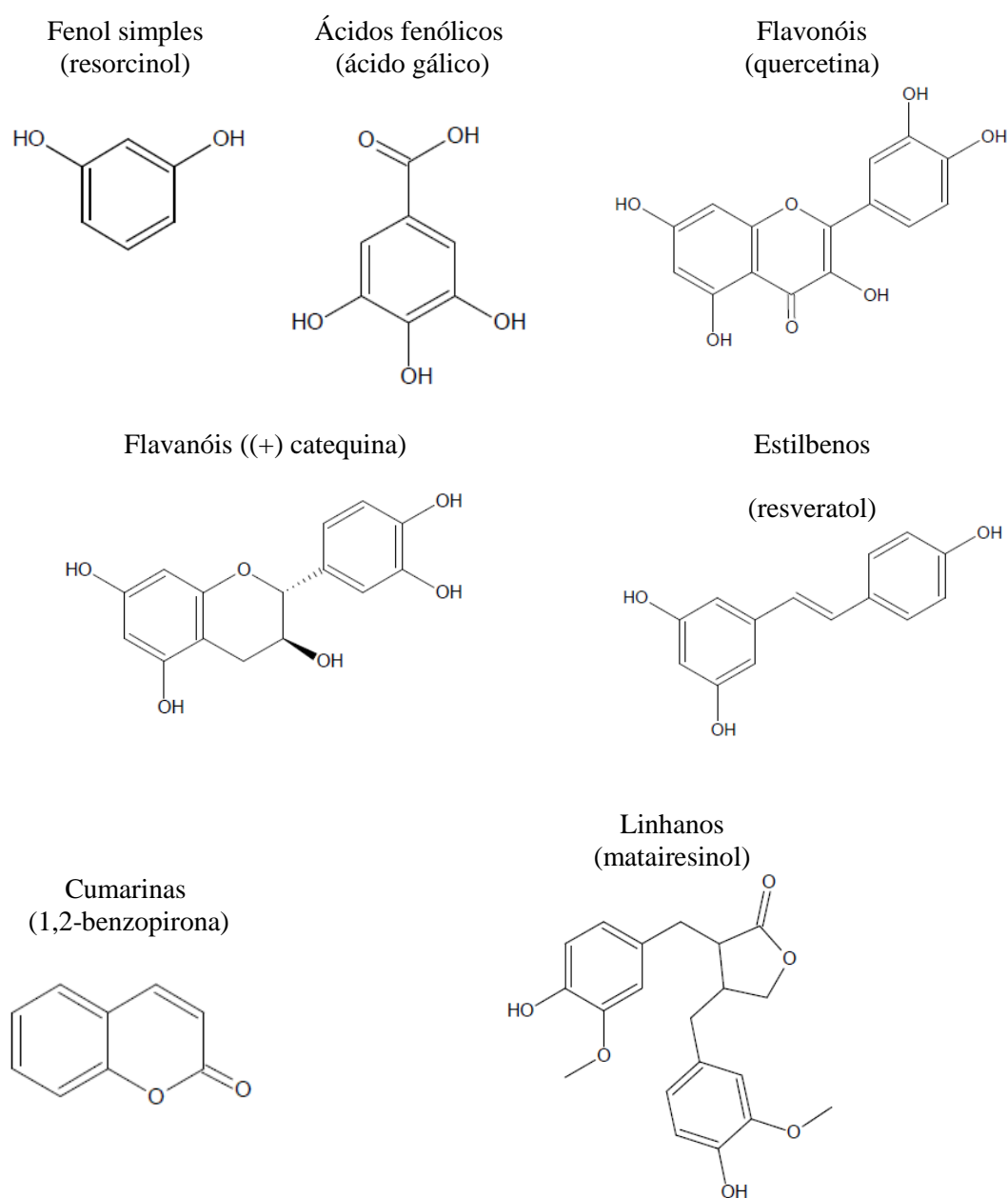


Figura 2.3- Estrutura básica de alguns compostos fenólicos (Adaptado de Apak *et al.*, 2007).

Alguns compostos fenólicos estão presentes em muitos frutos, outros, por seu lado, são específicos de um determinado tipo de fruto ou vegetal. O conteúdo em compostos fenólicos dentro de uma mesma espécie pode variar consoante a estação do ano, a variedade, condições ambientais e climáticas, estado de saúde da planta, tipo de solo e estado de maturação (Sellappan *et al.*, 2002). No mirtilo, o conteúdo de polifenóis varia de acordo com a espécie, variedade, grau de maturação, solo, região e práticas de cultivo (Silveira *et al.*, 2007). Prior e colaboradores (1998), verificaram que mirtilos colhidos com maior grau de maturação aumentaram em 169 % o valor dos fenóis totais, relativamente ao fruto verde. De acordo com

Wang e colaboradores (1996), a atividade antioxidante está relacionada com o índice dos polifenóis, sugerindo que, a concentração de polifenóis no fruto, possa ser indicadora da sua capacidade antioxidante.

Os polifenóis são muito importantes na prevenção da auto-oxidação, inibem ou ativam uma grande variedade de sistemas enzimáticos dos mamíferos, são quelantes de íons metálicos, sequestrantes de radicais livres (Sellappan *et al.*, 2002) e previnem a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) prevenindo, deste modo, a formação de placas de ateroma (Martínez-Flórez *et al.*, 2002). Os polifenóis têm demonstrado exercer a sua atividade antioxidante através de mecanismos de transferência eletrônica, mecanismos de transferência de átomos de hidrogénio e quelação de metais de transição. Certos polifenóis têm-se revelado capazes de induzir enzimas de fase II, tais como a glutathione-S-transferase (GST), conduzindo a um aumento da excreção de espécies oxidativas, ou de induzir as enzimas antioxidantes, ao mesmo tempo que se revelam capazes de inibir a ação de enzimas oxidativas como os citocromos P450 (CYPs), ciclooxigenases ou lipoxigenases (revisto em Ferguson, 2001).

Para além das propriedades antioxidantes, muitos polifenóis, apresentam igualmente propriedades antiinflamatórias, antimutagénicas e/ou anticarcinogénicas, *in vitro* ou em sistemas animais, havendo uma correlação entre o consumo de antioxidantes polifenólicos e a redução do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, bem como de determinados tipos de cancro (revisto em Ferguson, 2001).

Conforme já foi referido anteriormente, os polifenóis encontram-se amplamente distribuídos pelos alimentos de origem vegetal. Entre eles destacam-se os flavonoides, em particular as antocianinas, devido à sua elevada ocorrência natural em alimentos, especialmente frutos, vegetais, folhas verdes e sementes (Sellappan *et al.*, 2002).

2.3.1. Os flavonoides

Os flavonoides são uma classe de moléculas de baixo peso molecular, com estrutura base C6-C3-C6, constituída por dois anéis benzénicos ligados através de um anel pirano (Figura 2.4). Estes compostos encontram-se em grande quantidade nas folhas, sementes, flores e frutos tendo já sido identificados mais de 4000 diferentes flavonoides (Heim *et al.*, 2002).

Os flavonoides são metabolitos secundários produzidos pelas plantas para proteção contra os efeitos da radiação ultravioleta, herbívoros e agentes patogénicos, devido às suas propriedades fungicidas e bactericidas (Heim *et al.*, 2002). Desempenham um papel importante na biologia vegetal, respondem à luz e controlam os níveis de auxinas reguladoras do

crescimento e diferenciação das plantas, são importante na fixação de metais como o ferro e o cobre e conferem coloração às plantas podendo, desta forma, contribuir para os fenómenos de polinização (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

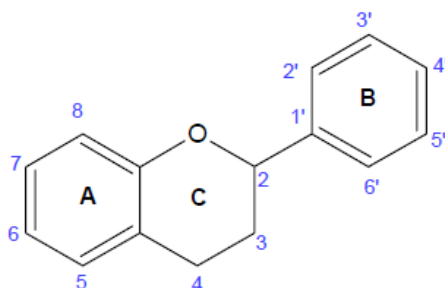


Figura 2.4 - Estrutura base dos flavonoides composta por dois anéis benzênicos (A e B) ligados através de um anel pirano (C) (Heim *et al.*, 2002).

Os flavonoides podem, de acordo com a sua estrutura, ser divididos em sub-grupos que incluem as flavonas, flavonóis, flavanóis, flavanonas, isoflavonas e antocianidinas (Figura 2.5) (Ferreira e Abreu, 2007).

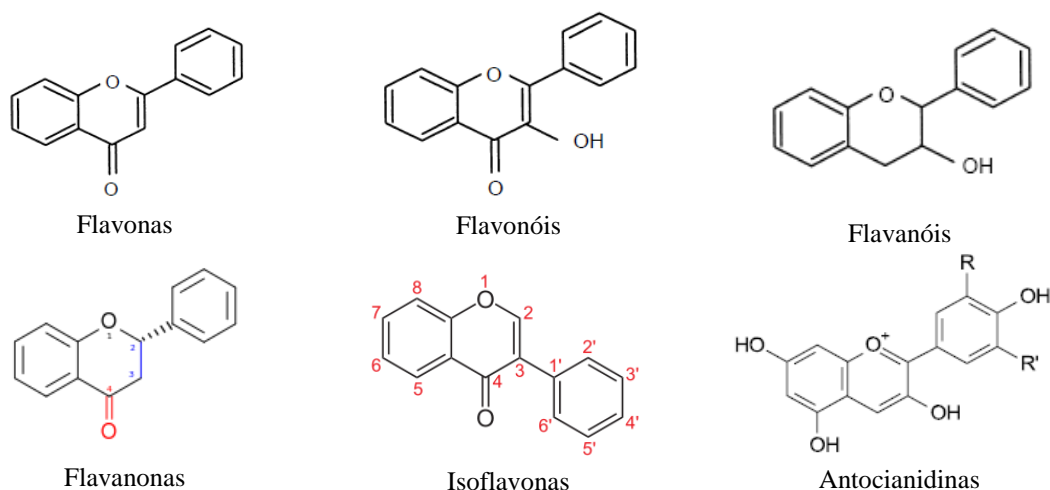


Figura 2.5 - Estrutura básica de alguns tipos de flavonoides (adaptado de Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

Os flavonoides não são sintetizados no organismo humano tendo, por isso, obrigatoriamente que ser obtidos pela dieta, através da ingestão de alimentos de origem vegetal que os contenham, ou de suplementos alimentares (Cao *et al.*, 1997). Embora os hábitos alimentares sejam muito diversificados, estima-se que o valor médio de ingestão de flavonoides se situe entre os 20 e os 26 mg/dia sendo predominantes os flavonóis, especialmente a

quercetina (Martínez-Flórez *et al.*, 2002). Desta forma, os níveis de ingestão de flavonoides excede o de outros antioxidantes como o β -caroteno (2 a 3 mg/dia) ou a vitamina E (7 a 10 mg/dia) sendo aproximadamente igual a um terço da ingestão de vitamina C (70 a 100 mg/dia) (Martínez-Flórez *et al.*, 2002). Desta forma, os flavonoides representam uma importante contribuição para o potencial antioxidante da dieta humana.

Diversos estudos relacionam os flavonoides com múltiplos efeitos benéficos sobre a saúde. Assim, uma dieta rica em flavonoides está relacionada com uma diminuição da incidência de doenças cardíacas e com a diminuição da taxa de mortalidade a estas associada (Heim *et al.*, 2002). Alguns flavonoides evitam a oxidação lipídica, possuem atividades antitumorais, antiisquêmicas, antialérgicas e antiinflamatórias (Cao *et al.*, 1997), diminuem o risco de desenvolvimento de aterosclerose graças à sua capacidade de inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), reduzem a adesão e agregação plaquetária, têm ação antiinflamatória nos tecidos vasculares e reduzem a absorção de lipoproteínas no endotélio (Neto, 2007; Silveira *et al.*, 2007). Alguns destes compostos obtidos através da dieta, tais como a quercetina, miricetina e caenferol têm um efeito protetor contra alterações do DNA (Duthie, 2007).

Os flavonoides podem exercer a sua atividade antioxidante de diferentes formas: sequestro de ROS por transferência de átomos de hidrogénio ou doação de eletrões; prevenção da formação de espécies reativas de oxigénio via reação de Fenton, através da quelação dos iões metálicos (Martínez-Flórez, *et al.*, 2002); interação com outros antioxidantes (Apak *et al.*, 2007), apresentando com estes efeitos sinérgicos (Silva *et al.*, 2002). Os flavonoides têm, igualmente, demonstrado a capacidade de ativar enzimas antioxidantes (Hollman e Katan, 1997; Heim *et al.*, 2002), reduzir radicais α -tocoferol e de inibir enzimas oxidativas, tais como lipooxigenases, xantina-oxidase (Cao *et al.*, 1997), bem como os citocromos P450, especialmente os da sub-família CYP1A (Heim *et al.*, 2002).

Muitos flavonoides são efetivamente sequestrantes de radicais, esta propriedade só por si não implica um efeito benéfico, uma vez que após o sequestro se forma um radical flavonoide. Caso se forme um flavonoide muito reativo este irá propagar a reação iniciada pelo ataque do radical, pelo contrário, se o radical flavonoide for muito estável não irá reagir de imediato, este flavonoide atuará como antioxidante (Hollman e Katan, 1997).

A atividade antioxidante dos flavonoides e dos seus metabolitos *in vitro* depende do arranjo dos grupos funcionais na sua estrutura base (Heim *et al.*, 2002). Silva e colaboradores (2002) verificaram que flavonoides com maior número de grupos hidroxilo, em particular ligados ao anel B (Figura 2.4), apresentavam maior capacidade antioxidante. Por outro lado, a presença de um grupo hidroxilo ligado ao C-3 parece contribuir para a elevada capacidade antioxidante dos

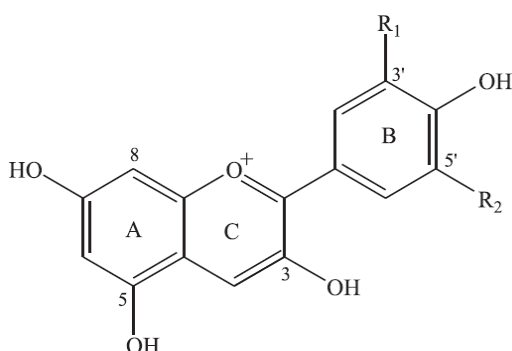
flavonóis. O grupo hidroxilo nesta posição contribui para o aumento da planaridade da molécula, devido ao estabelecimento de ligações por pontes de hidrogénio deste com o H-2' ou o H-6' do anel B, fixando a posição do anel B no mesmo plano dos anéis A e C (Figura 2.4) (Silva *et al.*, 2002). Para flavonoides sem grupos hidroxilo no anel B, a presença em simultâneo da ligação dupla (C2,3) e do grupo (OH) no átomo de carbono 3 é determinante para uma capacidade antioxidante elevada, provavelmente em resultado de um aumento da planaridade da molécula que daí resulta (Silva *et al.*, 2002). Para flavonoides com a mesma estrutura química básica verificou-se que a capacidade de sequestro de radicais peróxido aumentava com o aumento dos grupos hidroxilo substituintes (Silva *et al.*, 2002). A inibição da lipoperoxidação pelos flavonoides também aumenta com a sua lipofilicidade, devido à maior capacidade de penetração nas membranas biológicas e consequente capacidade de sequestro dos radicais iniciadores (Silva *et al.*, 2002).

2.3.1.1. As antocianinas

As antocianinas são glucósidos das antocianidinas, um dos sub-grupos dos flavonoides. São pigmentos naturais, responsáveis por uma variedade de cores atrativas de bagas, incluindo os mirtilos, frutos, flores e folhas, que variam do vermelho ao azul (Silveira *et al.*, 2007). Quando presentes nas flores atraem insetos polinizadores. Alguns destes compostos têm propriedades farmacológicas importantes e são usados com fins terapêuticos (Kader *et al.*, 1996).

A composição e distribuição de antocianinas nos mirtilos dependem de fatores genéticos, do grau de maturação e das condições ambientais (Kader *et al.*, 1996). O grau de maturação está relacionado com o teor de antocianinas nas células epidérmicas e subepidérmicas do fruto (Kader *et al.*, 1996) onde estas substâncias parecem concentrar-se (Prior *et al.*, 1998), à medida que o fruto amadurece diminui a concentração em flavonóis e procianidinas e aumenta a concentração em antocianinas (Burdulis *et al.*, 2007).

Kader e colaboradores (1996) identificaram, através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), 15 tipos de antocianinas em extratos de mirtilo da cultivar “coville” do grupo “Highbush”: 3-monoarabinósidos, 3-monogalactósidos e 3-monoglucósidos de cianidina, delphinidina, petunidina, malvidina e peonidina (Figura 2.6). Burdulis e colaboradores (2007) identificaram as mesmas antocianinas noutras cultivares obtidas em diferentes regiões da Europa. O teor total de antocianinas foi variável de acordo com a origem da amostra, no entanto, em todas as amostras, as cianidinas apresentaram os teores mais elevados e, na maioria das amostras, as malvidinas e peonidinas apresentaram os teores mais baixos.



Antocianidina	R ₁	R ₂
Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	OH
Pelargonidina	H	H
Petunidina	OCH ₃	OH
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃

Figura 2.6- Estrutura de algumas antocianidinas, metabolitos resultantes da metabolização das antocianinas presentes nos mirtilos (adaptado de Zhang *et al.*, 2005).

Tal como a maioria dos flavonoides, as antocianinas são antioxidantes capazes de prevenir a peroxidação lipídica (Zafra-Stone *et al.*, 2007), apresentando, igualmente, outros efeitos benéficos para a saúde como, por exemplo, atividade antiinflamatória, prevenção da mutagénese e carcinogénese, capacidade de induzir, *in vitro*, a apoptose em células humanas leucémicas e de carcinoma do cólon (Prior *et al.*, 1998). Alguns destes efeitos benéficos para a saúde podem, de alguma forma, estar relacionados com propriedades antioxidantes das antocianinas. As antocianinas, incluindo a cianidina e alguns glucosídeos, revelaram atividade antimutagénica detetada através do teste de Ames e em ensaios de troca de cromátides irmãs, revelando-se eficazes na inibição dos danos oxidativos no DNA em células do tecido muscular liso em ratos (Duthie, 2007). As antocianidinas cianidina, delfinidina, pelargonidina, petunidina e malvidina mostraram atividade antiproliferativa em células tumorais humanas de estômago, cólon, mama, pulmão e sistema nervoso central (Zhang *et al.*, 2005).

2.3.2. Biodisponibilidade dos polifenóis

Biodisponibilidade define-se como a taxa e extensão na qual um composto é absorvido e fica disponível num determinado órgão-alvo. A biodisponibilidade de uma substância depende da solubilidade, permeabilidade, estabilidade no trato gastrointestinal e biotransformação antes de atingir a circulação sanguínea, quando ingerida por via oral (revisto em Ratnam *et al.*, 2006). O conhecimento da biodisponibilidade dos polifenóis constitui um fator chave para poder sugerir que os antioxidantes presentes nos alimentos possam, de facto, conferir uma maior proteção contra o “stress” oxidativo de quem os consome. Efetivamente, para que estes compostos possam apresentar efeitos *in vivo*, têm que chegar aos tecidos, na sua forma nativa ou

na forma metabolizada, numa dose suficientemente elevada para poder exercer efeito biológico (Galvano, 2008).

Os polifenóis têm biodisponibilidade limitada e podem ser extensamente metabolizados. No entanto, apesar desta limitada disponibilidade, estudos efetuados em humanos sugerem que mesmo essa pequena quantidade absorvida possa ser suficiente para exercer efeitos benéficos na saúde (revisto em Ferguson, 2001; Williamson e Manach, 2005). Por exemplo, os níveis de quercetina no sangue após a ingestão de cebolas, de catequinas após a ingestão de vinho tinto ou de isoflavonas veiculadas pela soja atingem concentrações da ordem dos micromolar, ou seja concentrações semelhantes àsquelas em que exercem os seus efeitos protetores nos ensaios *in vitro* (Williamson e Manach, 2005).

A biodisponibilidade difere grandemente entre os vários tipos de polifenóis, e os mais abundantes não são necessariamente os que apresentam melhor perfil de biodisponibilidade, não sendo por isso os que atingem maiores concentrações no interior das células humanas, ou porque não são resistentes à digestão gastro-intestinal, ou porque são pouco absorvidos no intestino, altamente metabolizados ou rapidamente eliminados (Pantelidis *et al.*, 2007). O ácido gálico e as isoflavonas parecem ser os polifenóis mais bem absorvidos, seguidos pelas catequinas, flavanonas e glicosídeos de quercetina, sendo as proantocianidinas, as catequinas galato do chá e as antocianinas os polifenóis de mais difícil absorção (Manach *et al.*, 2005; Pantelidis *et al.*, 2007; Galvano, 2008).

A metabolização pela flora intestinal pode, igualmente, ter um efeito preponderante na biodisponibilidade dos polifenóis. Com efeito, os polifenóis que não forem absorvidos no trato gastro-intestinal, podem ser metabolizados por estas bactérias, originando metabolitos passíveis de ser absorvidos no epitélio do cólon e, desta forma, chegar à corrente sanguínea. Por exemplo, as proantocianidinas têm demonstrado alguns efeitos em ensaios epidemiológicos embora se saiba que a sua absorção intestinal seja muito reduzida. Desta forma, é possível que os efeitos biológicos associados a estes compostos resultem de algum metabolito formado no decurso da sua metabolização pelas bactérias da flora intestinal (Williamson e Manach, 2005).

Nos alimentos os flavonoides existem como 3-*O*-glucosídeos e polímeros, o substituinte glicosídico mais comum é a glucose, podendo, no entanto, surgir açúcares diferentes, como, por exemplo, a galactose ou a arabinose. A ligação β estabelecida entre a unidade glicosídica e a aglicona é resistente à hidrólise enzimática das enzimas pancreáticas, podendo ser hidrolisada por ação da flora intestinal e por ação de β -endoglucosídeos intestinais (Heim *et al.*, 2002). A absorção intestinal dos flavonoides varia consideravelmente com o alimento onde se encontram e com a diversidade de resíduos de açúcares e de outros grupos funcionais ligados à estrutura base. Dependendo do açúcar a que se encontram ligados, os flavonoides glicosilados podem ou

não ser mais facilmente absorvidos do que as respectivas aglíconas. A absorção pode também depender da dose, do veículo de administração, da dieta, da microflora do cólon e pode, ainda, variar com o sexo (Heim *et al.*, 2002). A sua absorção pode também ser aumentada com a coingestão de alimentos ricos em gordura. Estima-se que apenas 5% dos flavonoides ingeridos atinjam a circulação sanguínea, ligam-se aí às proteínas e às membranas celulares das células sanguíneas (Ruel e Couillard, 2007).

Outro dos fatores chave para poder extrapolar os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* para a realidade que ocorre *in vivo* é o conhecimento da biotransformação dos polifenóis. Com efeito, a biotransformação, ao alterar a estrutura dos compostos químicos, pode originar metabolitos com propriedades bioativas diferentes das dos compostos originais. A biotransformação dos flavonoides resulta na sua hidroxilação, metilação, conjugação com o ião sulfato, ácido glucurónico ou glicina (Heim *et al.*, 2002; Martínez-Flórez, *et al.*, 2002). Desta forma, os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* realizados com os alimentos podem não ser necessariamente relevantes para a situação *in vivo* (Williamson e Manach, 2005).

2.3.3. Propriedades pró-oxidantes dos polifenóis

Alguns polifenóis considerados antioxidantes podem atuar como pró-oxidantes na presença de substâncias, como, por exemplo, o óxido nítrico (NO), ou quando presentes em doses elevadas (Ferguson, 2001). Com efeito, os polifenóis podem reduzir o ferro (III) a ferro (II) e, assim, gerar radicais hidroxilo através da reação de Fenton. Os polifenóis podem ainda ser reduzidos a quinonas e entrar em ciclos redox originando a produção de ROS, no entanto é provável que a quinona redutase, a catecol-metil-transferase e outras enzimas da fase II possam atenuar esse efeito (Scalbert *et al.*, 2005). Alguns compostos fenólicos podem, no decurso da sua regeneração, gerar radicais secundários reativos capazes de oxidar proteínas e lípidos. Radicais hidroxilo derivados de flavonoides semelhantes à quercetina iniciam a peroxidação de lípidos das membranas celulares e causam danos ao nível do DNA (revisto em Ferguson, 2001).

Alguns flavonoides apresentam *in vitro* propriedades mutagénicas, parecendo este efeito estar relacionado com propriedades pró-oxidantes (Cao *et al.*, 1997). Por sua vez, a atividade pró-oxidante parece ser diretamente proporcional ao número de grupos hidroxilo na molécula (Heim *et al.*, 2002; Apak *et al.*, 2007). No entanto, quer a glicosilação quer a metilação dos grupos hidroxilo atenua o seu comportamento pró-oxidante (Heim *et al.*, 2002).

Embora alguns ensaios *in vivo*, realizados em animais de laboratório, atribuam efeitos pró-carcinogénicos a alguns flavonoides, particularmente à quercetina, a maioria destes ensaios

apontam no sentido destes compostos terem uma atividade anticancerígena. É possível que as enzimas de biotransformação, particularmente as da fase II, possam desempenhar um papel importante na limitação dos efeitos mutagênicos dos polifenóis *in vivo* (Scalbert *et al.*, 2005).

2.4. Mutagêneos e antimutagêneos alimentares

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é a macromolécula que contém a informação genética da célula inscrita na sequência de bases que a constituem (Stryer, 1988). Esta macromolécula possui uma estrutura complexa, passível de sofrer modificações por ação de compostos químicos, endógenos ou exógenos, de radiações ou de vírus (Wogan *et al.*, 2004). Estas alterações podem dar origem a mutações, as quais podem ocorrer por alterações na sequência de bases, resultantes de trocas, deleções ou inserções de um ou mais pares de bases, ou por alteração da estrutura de cromossomas através da inserção, deleção, duplicação, inversão ou translocação de segmentos cromossômicos, assim como por duplicação ou perda de cromossomas (Mortelmans e Zeiger, 2000).

As mutações podem afetar o funcionamento celular ou dar origem a alterações na função ou da estrutura celular, dependendo do tipo de genes em que ocorrem. Se os genes afetados forem os que regulam o processo de divisão celular (proto-oncogenes e genes supressores de tumor), ou genes responsáveis pela manutenção da integridade do DNA, as mutações podem conduzir ao aparecimento de tumores (Bishop, 1991). A estreita correlação que se verifica entre os processos de mutagenese e cancerígenese leva a que os ensaios de mutagenicidade desempenhem um papel fundamental na identificação de agentes potencialmente cancerígenos.

Os compostos químicos de natureza acentuadamente lipofílica têm facilidade em ser absorvidos através das membranas biológicas, ao mesmo tempo que os organismos têm dificuldade em os eliminar, visto os meios de excreção serem maioritariamente de natureza aquosa. Consequentemente, para que se não verifique uma acumulação tóxica destes compostos no organismo, torna-se necessário efetuar a sua biotransformação, ou seja, a sua conversão a compostos mais hidrofílicos e, portanto, mais facilmente excretáveis. O processo de biotransformação de xenobióticos consiste, assim, numa via de destoxificação, uma vez que permite ao organismo excretar compostos potencialmente tóxicos que, de outra forma, nele se acumulariam. Contudo, por vezes, verifica-se que os produtos resultantes das reações de biotransformação são altamente reativos face ao DNA, podendo, deste modo, causar lesões a esta biomolécula (Duarte, 2008).

A maioria dos cancerígenos que atuam sobre o DNA requerem ativação prévia, normalmente através dos citocromos P450 (CYP), para exercerem o seu efeito mutagénico. Se

estas lesões não foram reparadas podem dar origem a erros durante a replicação do DNA, que podem resultar em mutações. A morte celular programada ou apoptose permite eliminar as células que apresentem lesões no DNA, prevenindo, assim, a persistência de células com alterações na estrutura desta biomolécula (Figura 2.7).

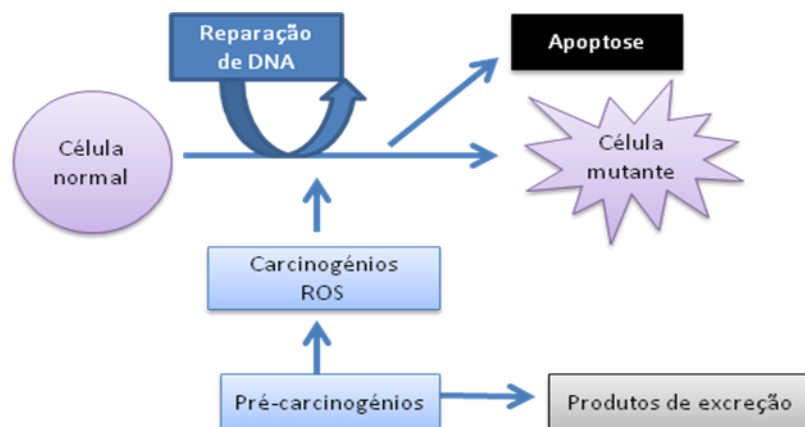


Figura 2.7- Diagrama esquemático dos passos envolvidos na indução de mutações (adaptado de Ferguson *et al.*, 2004).

Existem, assim, vários passos envolvidos na indução de mutações. A probabilidade da mutação ocorrer através da exposição a mutagêneos pode ser modelada por fatores genéticos do indivíduo, tais como a existência de polimorfismos nos genes das enzimas de biotransformação, polimorfismos nos genes dos sistemas enzimáticos de reparação do DNA e polimorfismos nos genes associados ao controle do ciclo celular e apoptose (Ferguson *et al.*, 2004).

Os compostos com atividade mutagênica/cancerígena veiculados pela alimentação podem ser constituintes naturais dos alimentos, contaminantes formados durante o seu armazenamento, produção ou processamento ou ainda aditivos intencionalmente adicionados para preservar ou melhorar as suas características. Além dos cancerígenos exógenos, a produção endógena de mutagêneos pode ser, igualmente, um fator importante no surgimento de cancro. Alguns dos fatores de risco conhecidos podem atuar aumentando essas taxas de mutação espontânea. Estudos epidemiológicos têm relacionado alguns tipos de cancro com uma dieta inadequada, por exemplo, a obesidade pode contribuir indiretamente para o risco mutagênico, através da estimulação inadequada de respostas imunes que aumentam os danos no DNA (Ferguson *et al.*, 2004). Apesar dos alimentos de origem vegetal, como frutos e legumes, serem considerados benéficos para a saúde, algumas substâncias presentes em plantas expressam atividade citotóxica e genotóxica e apresentam correlação com o surgimento de tumores (Yen *et al.*, 2001).

Ao mesmo tempo que pode constituir uma fonte de exposição a compostos mutagénicos e, por isso, potencialmente cancerígenos, a alimentação pode, igualmente, veicular compostos com atividade antimutagénica. Entre os compostos com propriedades antimutagénicas contam-se alguns nutrientes obtidos pela dieta, como, por exemplo, as fibras dietéticas, aminoácidos ou ácidos gordos de cadeia curta e outros compostos classificados como compostos bioativos que surgem em pequenas quantidades essencialmente em alimentos de origem vegetal (fitoquímicos) (Ferguson *et al.*, 2004).

Os compostos com atividade antimutagénica podem exercer essa atividade através de diversos mecanismos que incluem a inibição da absorção de compostos mutagénicos, alteração da sua biotransformação, desativação de ROS ou de outras espécies capazes de lesar o DNA, proteção dos locais nucleofílicos do DNA ou estimulação dos mecanismos de reparação desta molécula (Figura 2.8) (Ferguson *et al.*, 2004).

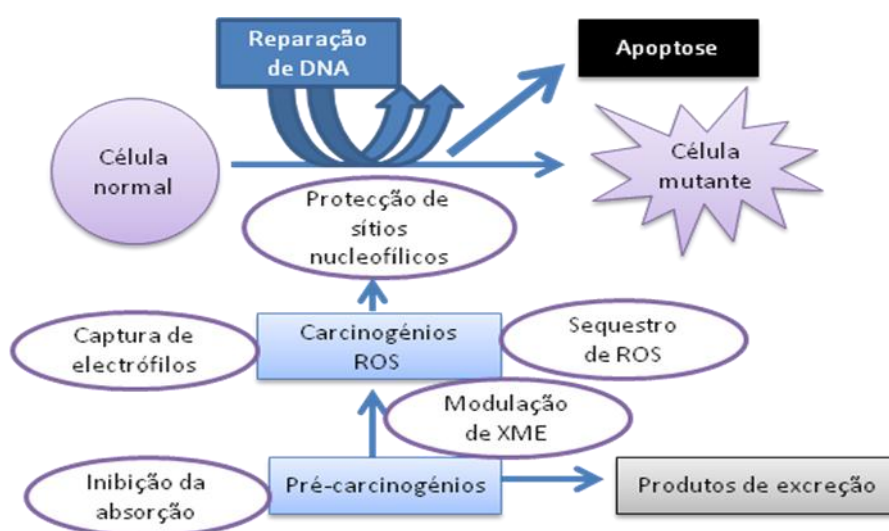


Figura 2.8- Diagrama esquemático mostrando pontos nos quais os antimutagénicos obtidos através da dieta podem ter um impacto na probabilidade de um determinado agente mutagénico originar mutações (XME-Enzimas de biotransformação)(adaptado de Ferguson *et al.*, 2004).

Diversos trabalhos têm demonstrado que os polifenóis apresentam capacidade antimutagénica que pode manifestar-se através de diferentes mecanismos. Assim, diversos polifenóis têm mostrado inibir a absorção de mutagénicos como o benzo[a]pireno ou inibir a formação gástrica de *N*-nitrosaminas, podendo, por isso, o estômago ser o principal local onde os polifenóis previnem a cancerigénese. Mais ainda, certos polifenóis parecem influenciar a atividade de enzimas de reparação do DNA através da modulação da expressão dos seus genes,

inibir a ação de enzimas oxidativas e desativar espécies oxidativas. Além do já referido, alguns flavonoides, e outros compostos fenólicos, obtidos através da dieta podem inibir citocromos P450 específicos envolvidos na bioativação de cancerígenos e proteger contra mutagénese através deste mecanismo (revisto em Ferguson, 2001).

3. Materiais e Métodos

3.1. Caracterização das amostras de mirtilos

Na realização deste trabalho foram utilizadas seis cultivares comerciais do grupo “Southern Highbush” (O’Neal, Star, Georgia Gem, Sharpblue, Misty e Jubilee) de cultivo biológico, gentilmente cedidas pela empresa MIRTISUL, sediada em Aldeia do Pico, Grândola, Setúbal, Portugal.

Os frutos foram colhidos manualmente, nas plantações da empresa MIRTISUL, em maio e junho (no caso da cultivar Jubilee) de 2010, de plantas sadias e no estado de maturação correspondente à sua comercialização: frutos com a totalidade da coloração desenvolvida mas sem perda de turgescência. Foram colhidas amostras de aproximadamente 300 g de cada cultivar, de entre três a seis plantas de cada genótipo (Figura 3.1). Os frutos foram colhidos durante a manhã (entre as 10:00 h e as 11:00 h), foram colocados em embalagens de polietileno usadas na sua comercialização e transportados até ao laboratório no escuro, sob refrigeração, tendo sido preparadas as amostras para análise num no prazo máximo de duas horas.

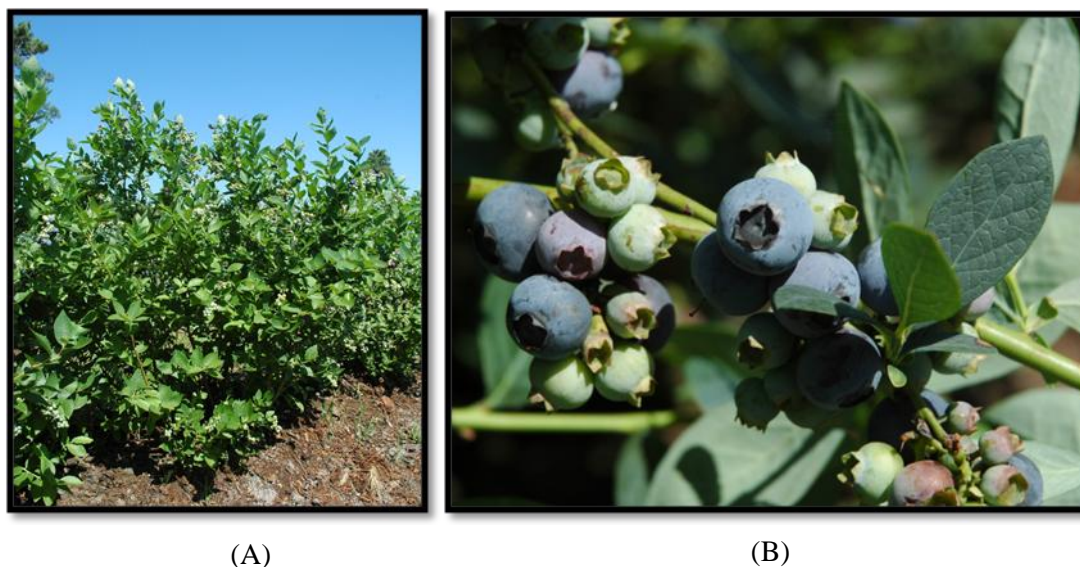


Figura 3.1- (A) Aspeto geral do arbusto do grupo “Southern Highbush” (híbridos interespecíficos de *V. corymbosum* L.) e (B) Aspeto dos frutos em diferentes estágios de maturação.

3.2. Reagentes e meios de cultura

Na realização do presente trabalho foram utilizados os seguintes reagentes e meios de cultura: acetato de amónio (Riedel-de Haën, 98%); acetato de sódio tri-hidratado (Panreac, 99%); ácido L (+) ascórbico (Panreac, 99%); ácido cítrico mono-hidratado (JMGS, 99,8%); ácido clorídrico (Panreac, 37%); ácido gálico (Merck, 99,5%); 2,2'-azobis(2-metilpropionamidina)dihidrocloreto (AAPH) (Sigma-Aldrich, 97%); azul de nitrotetrazólio (NBT^{2+}) (Sigma); Bacto agar (Becton Dickinson and Company); biotina (Sigma-Aldrich, 99%); carbonato de sódio (VReis); cloreto de cobre (II) bihidratado (Riedel-de Haën, 99%); cloreto de ferro (III) hexa-hidratado (Merck, 99%); cloreto de potássio (Panreac, 99%); cloreto de sódio (Panreac, 99,5%); dihidrogenofosfato de sódio (Panreac, 98%); dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma reduzida (NADH) (Sigma, 97%); etanol (Riedel-de Haën, 99%); fluoresceína (Sigma-Aldrich); D-glucose monohidratada (Panreac); hidrogenofosfato de dipotássio (Becton Dickinson and Company, 97,5%); hidróxido de sódio (Merck, 99%); histidina (Merck, 99%); meio de cultura Nutrien Broth (NB) nº2 (Oxoid); metanol (Riedel-de Haën, 99,8%); metossulfato de fenazina (PMS) (Sigma, 90%); neocuproína (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina) (Sigma); peróxido de hidrogénio (Panreac, 30%); reagente de Folin-Ciocalteu (Panreac); sal dissódico de ácido etilenodiaminatetracético (EDTA) (Panreac, 99%); sal dissódico de ácido 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina-4',4''-dissulfónico (ferrozina) (Sigma-Aldrich); sulfato de magnésio heptahidratado (Merck, 99,5%); sulfato ferroso hepta-hidratado (Riedel-de Haën, 99%); *tert*-butil hidroperóxido (t-BHP) (Sigma-Aldrich, 70% em H_2O); 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) (Fluka, 99%); hidrogenofosfato de amónio e sódio tetrahidratado ($\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Sigma, 99%) e trolox (Acros Organics, 97%). Na preparação de todas as soluções, diluições e meios de cultura, utilizou-se água ultrapura, captada a partir de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Molsheim, França).

3.3. Preparação dos extratos

De acordo com Smith e colaboradores (2000), a melhor estratégia de armazenamento dos extratos é mantê-los no escuro a baixas temperaturas, separados em alíquotas, de forma a retirar apenas a quantidade necessária a cada ensaio. Assim, em todos os passos realizados até à obtenção dos extratos, separação em alíquotas e realização dos ensaios, foi minimizado o contacto com a luz, oxigénio e temperaturas elevadas.

Os extratos foram preparados de acordo com o procedimento descrito por Connor e colaboradores (2002), com pequenas adaptações. Assim, aos mirtilos previamente triturados foi

adicionado metanol acidificado com ácido clorídrico (0,1% volume/volume) e arrefecido em gelo, numa proporção de 10 g de fruto por cada 20 mL de solvente. A mistura foi agitada em gelo durante 20 minutos e filtrada, por gravidade, através de um filtro de papel (Figura 3.2 A e B). Repetiu-se a extração, a partir dos resíduos recuperados do papel de filtro, usando igual volume de metanol acidificado, nas mesmas condições. O filtrado total recuperado foi diluído a 50 mL, num balão volumétrico, com o solvente da extração. Os extratos assim obtidos foram evaporados em rotavapor (Modelo Büchi R-200) (Figura 3.2 C), utilizando-se um banho termostatzado (Büchi heating bath B-490), à temperatura de 37 °C. Os resíduos obtidos foram ressuspensos em 50 mL de água ultrapura, em balão volumétrico, de modo a ficarem com uma concentração final de 0,2 g/mL, e, em seguida, filtrados em ambiente asséptico, em câmara de fluxo laminar, usando membranas estéreis Millipore Millex GP com poro de 0.22 µm. Os extratos assim esterilizados foram distribuídos por alíquotas de 1,5 mL e congeladas a -50 °C.

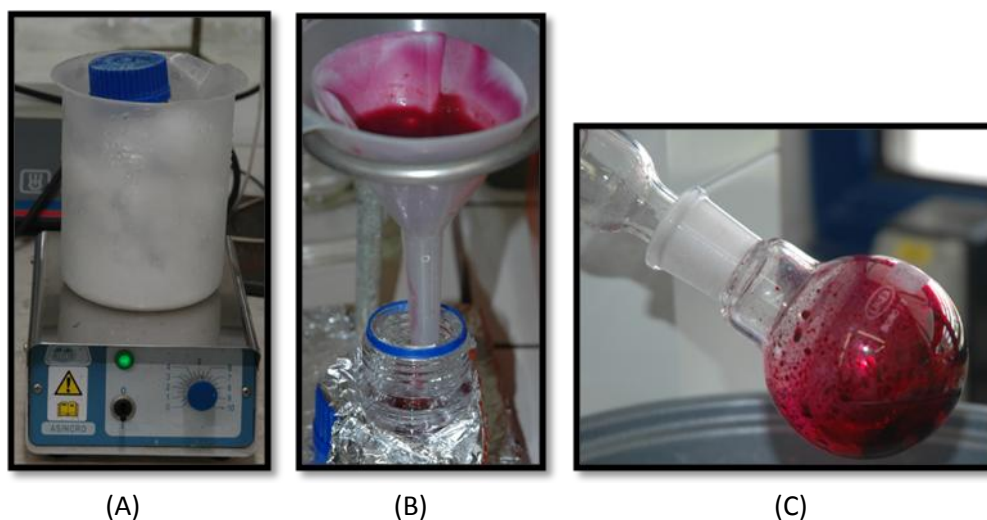


Figura 3.2 - Diferentes fases do processo de extração utilizado: (A) Extração em banho de gelo com metanol acidificado; (B) Recuperação do filtrado; (C) Evaporação do solvente.

3.4. Determinação do teor de sólidos solúveis (grau Brix)

O grau Brix indica a percentagem de sólidos solúveis no sumo do fruto. Este parâmetro pode ser influenciado por vários fatores nos quais se incluem, a variedade, região de cultivo, fatores climáticos e estado de maturação (Turkmen e Eks, 2011). Cada grau Brix corresponde a 1g de sólidos solúveis/açúcares por 100 g de sumo. A determinação do grau Brix é usada

como referência de ponto de colheita e consumo para a maioria das frutas, especialmente para as não-climáticas.

O sumo extraído de 4 a 5 bagas de cada cultivar foi utilizado para determinar a concentração de sólidos solúveis, através de um refratômetro manual, com correção de temperatura, Modelo EUROMEX – 5532 (0-32%), sendo o resultado expresso em percentagem (grau Brix).

3.5. Determinação dos fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu

O método de Folin-Ciocalteu, utilizado na quantificação dos fenóis totais, baseia-se na capacidade destes compostos sofrerem oxidação e quelarem metais originando complexos com absorção de radiação na zona do UV-Visível. Os grupos hidroxilo dos compostos fenólicos podem ser quantificados através de uma reação de oxidação-redução recorrendo ao reagente de Folin-Ciocalteu (Neves *et al.*, 2009). Em meio alcalino (pH10), o heteropolianião molibdotungsteniofosfórico presente no reagente de Folin-Ciocalteu é reduzido a uma mistura de óxidos de tungsténio e de molibdénio, de cor azul, pelos compostos fenólicos do extrato, na forma de ião fenolato. A intensidade de coloração azul desenvolvida, com um máximo de absorção a 765 nm, é proporcional ao teor de compostos fenólicos (Singleton *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2005). Este método é simples, sensível e preciso mas pode sofrer interferências de outros componentes da amostra capazes de reduzir igualmente o reagente de Folin-Ciocalteu como, por exemplo, adenina, alanina, ácido aminobenzóico, ácido ascórbico, histidina, indole, frutose, sulfito de sódio, sulfato de ferro, entre outros (Prior *et al.*, 2005).

Para a determinação dos compostos fenólicos totais utilizou-se o método descrito por Kosar e colaboradores (2008) com algumas modificações. Assim, em balões volumétricos de 10 mL introduziram-se 6 mL de água ultrapura, 100 µL de extrato, ou de suas diluições, e 500 µL de reagente de Folin-Ciocalteu sem diluição. A mistura foi deixada à temperatura ambiente durante 1 minuto, adicionou-se 1,5 mL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 20% (peso/volume) e perfez-se o volume a 10 mL com água ultrapura. Após incubação, durante 2 horas, a 25 °C e no escuro, a cor azul desenvolvida foi quantificada através da leitura da absorvância a 765 nm, num espectrofotómetro (SPEKOL 1500), contra um branco preparado da mesma forma mas utilizando 100 µL de água ultrapura, em substituição do mesmo volume de extrato. O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação de uma reta de calibração obtida da mesma forma que a descrita para as amostras mas utilizando, em vez destas, soluções de ácido gálico com concentrações entre os 50 e 500 mg/L.

Todas as determinações foram efetuadas em quadruplicado tendo os resultados sido expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por 100 g de peso fresco de mirtilos.

3.6. Quantificação das antocianinas monoméricas totais pelo método do pH diferencial

As antocianinas monoméricas sofrem uma transformação estrutural reversível em função do pH, que origina diferentes espectros de absorção. Assim, a pH 1,0 a forma predominante é a de oxónio colorido ($\lambda_{\text{max-vis}}$, 520 nm) enquanto que, a pH 4,5, a forma predominante é a de hemiacetal sem coloração (sem absorção a 520 nm) (Figura 3.3) (Lee *et al.*, 2005).

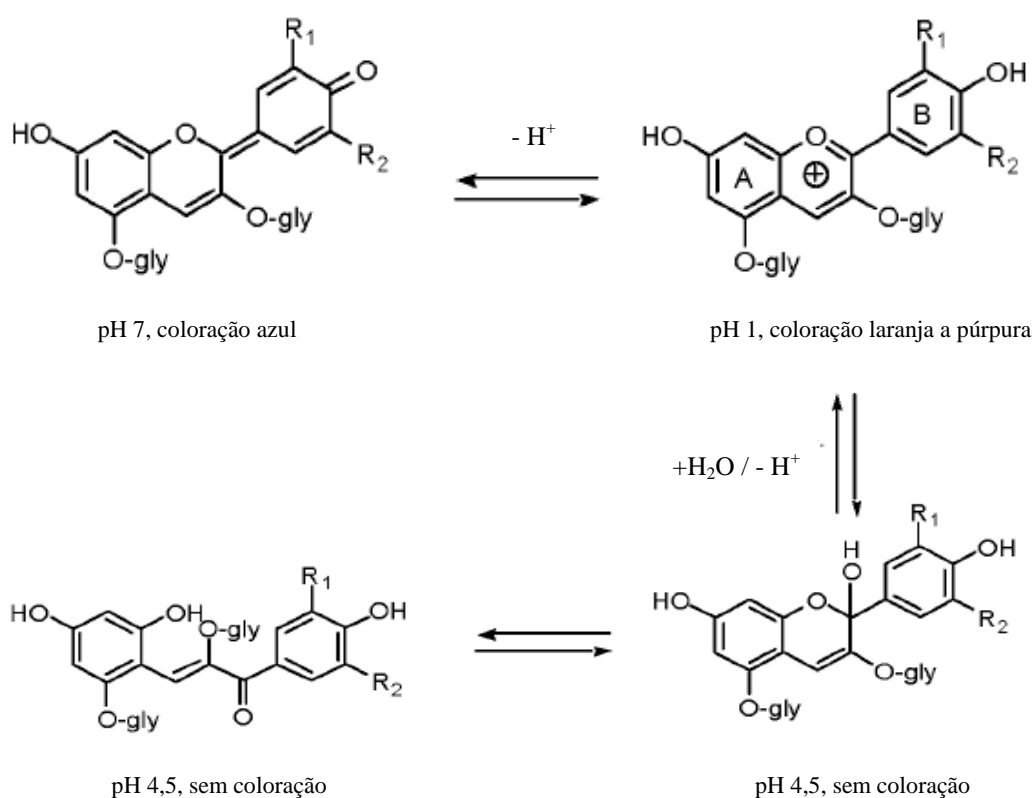


Figura 3.3- Transformação estrutural reversível das antocianinas monoméricas em função do pH (Lee *et al.*, 2005).

O método do pH diferencial permite medir, com rapidez e precisão, as antocianinas totais, mesmo quando em presença de pigmentos polimerizados e de outros compostos interferentes, uma vez que estes não sofrem a mesma alteração de absorção em função do pH. A diferença de absorção a 520 nm de um extrato a pH 1,0 e a pH 4,5 é, então, proporcional à quantidade de antocianinas totais (Lee *et al.*, 2005).

A determinação das antocianinas totais foi efetuada de acordo com o método descrito por Lee e colaboradores (2005). Assim, os extratos foram diluídos numa solução de cloreto de potássio 0,025 M, acidificada com ácido clorídrico até pH1, até que a absorvância a 520 nm das soluções ficasse dentro da zona linear do espectrofotômetro (SPEKOL 1500) (entre 0,2 e 1). Para que não fosse excedida a capacidade tampão dos reagentes, a percentagem de amostra na solução final nunca foi superior a 20%. Procedeu-se à mesma diluição dos extratos utilizando uma solução tampão de acetato de sódio 0,4 M a pH 4,5. Deixaram-se estabilizar as soluções durante 20 minutos e leu-se a absorvância, no referido espectrofotômetro, a 520 nm e a 700 nm, utilizando água ultrapura como branco. A leitura a 700 nm foi feita com o objetivo de eliminar possíveis interferências de alguns materiais uma vez que a este comprimento de onda as antocianinas não absorvem.

As amostras foram analisadas em quadruplicado, tendo o teor em antocianinas no extrato, expresso em mg equivalentes de cianidina-3-glucósido, sido determinado recorrendo à seguinte expressão:

$$\text{mg equivalentes/L} = (A \times \text{MM} \times \text{FD} \times 10^3) / \epsilon \times d$$

Sendo que: A corresponde a $[(A_{520} - A_{700})_{\text{pH1}} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH4,5}}]$; MM é a massa molar da cianidina-3-glucósido (449,2 g/mol); FD é o fator de diluição determinado; 10^3 o fator de conversão de g para mg; d o percurso ótico (1 cm) e ϵ o coeficiente de absorvidade molar da cianidina-3-glucósido ($26900 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Lee *et al.*, 2005). Os resultados foram expressos em mg equivalentes de cianidina/100 g de peso fresco de mirtilos.

3.7. Avaliação da capacidade antioxidante

3.7.1. Determinação da capacidade de quelação de Fe(II)

A ferrozina (3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina-4',4''-sal dissulfónico de sódio) pode formar complexos de cor vermelha com os iões Fe^{2+} , $[\text{Fe}(\text{Ferrozina})_3]^{4+}$, apresentando estes complexos um máximo de absorção a 565 nm. Na presença de agentes quelantes, a formação desses complexos é dificultada, resultando numa diminuição da coloração vermelha característica. As medições da diminuição da coloração, através da medição da diminuição da intensidade da absorção a 562 nm, permitem efetuar uma estimativa da capacidade de quelação do ferro da amostra (Geckil *et al.*, 2005).

A capacidade de quelação de ferro foi avaliada de acordo com a técnica descrita por Geckil e colaboradores (2005). Assim, as misturas reacionais foram preparadas misturando diferentes

volumes de amostra, ou de suas diluições, com 50 µL de uma solução de sulfato de ferro (II) (0,2 mM). Após uma incubação de cinco minutos, à temperatura ambiente, adicionaram-se 200µL de ferrozina (5 mM), ajustou-se o volume a 2000 µL com água, agitou-se vigorosamente a mistura obtida e incubou-se durante 10 minutos, também à temperatura ambiente. Terminada esta segunda incubação, leu-se a absorvância a 562 nm no espectrofotômetro (SPEKOL 1500). Realizaram-se igualmente um controlo negativo, substituindo a amostra por igual volume de água (solvente da amostra), e um controlo de interferência da cor da amostra, utilizando igual volume de amostra e completando a 2000 µL com água.

As amostras foram analisadas em quadruplicado tendo a percentagem de inibição da formação dos complexos $[\text{Fe}(\text{Ferrozina})_3]^{4-}$ sido calculada através da seguinte expressão:

$$\% \text{Inibição} = [(\text{Abs}_{\text{controlo negativo}}) - (\text{Abs}_{\text{amostra com ferrozina}} - \text{Abs}_{\text{amostra sem ferrozina}}) / (\text{Abs}_{\text{controlo negativo}})] \times 100$$

3.7.2. Determinação da capacidade de sequestro do peróxido de hidrogénio

O peróxido de hidrogénio apresenta um máximo de absorção a 230 nm. Desta forma, a percentagem de sequestro deste composto pode ser determinada pela diminuição da absorvância a 230 nm de uma solução de peróxido de hidrogénio na presença de amostra, por comparação com um branco (Magalhães *et al.*, 2008 ; Esmaili e Sonboli, 2010). O peróxido de hidrogénio forma-se *in vivo*, no decurso de diversos processos metabólicos. Assim, uma das vantagens deste ensaio é a de se utilizar um oxidante com relevância fisiológica.

A percentagem de sequestro do peróxido de hidrogénio foi determinada de acordo com o procedimento descrito por Esmaili e Sonboli (2010). Assim, em tubos de ensaio, misturaram-se 400 µL de extrato e 4,6 mL de solução 10 mM de H_2O_2 preparada em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4). A mistura foi incubada, no escuro, durante 30 minutos, a 25 °C. Findo o período de incubação, leu-se a absorvância das soluções num espectrofotômetro (SPEKOL 1500) a 230 nm, utilizando cuvetes de quartzo. Para cada uma das amostras foi preparado um branco com o mesmo volume de cada um dos extratos e 4,6 mL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,4), sem peróxido de hidrogénio. Foi ainda preparado um controlo para o ensaio, com 400 µL de água ultrapura e 4,6 mL da solução de H_2O_2 em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4). As amostras foram analisadas em quadruplicado tendo a percentagem de sequestro de H_2O_2 sido calculada utilizando a seguinte expressão:

$$\% \text{ sequestro} = [(\text{Abs}_{\text{controlo}} - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco da amostra}})) / (\text{Abs}_{\text{controlo}})] \times 100$$

3.7.3. Determinação da capacidade de sequestro do radical anião superóxido

O radical anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), à temperatura ambiente, reduz o azul de nitrotetrazólio (NBT^{2+}), originando o azul formazano (Figura 3.4). A geração do formazano é acompanhada pelo aparecimento de uma coloração púrpura que apresenta um máximo de absorção a 560 nm (Valentão *et al.*, 2001; Gülçin 2006b; Magalhães *et al.*, 2008; Alves *et al.*, 2010). Desta forma, se à mistura de reação se adicionar um composto com capacidade para captar o $O_2^{\bullet-}$, passam a existir, no meio reacional, dois compostos a competir pelo radical anião superóxido, o que se traduz por uma diminuição da extensão da redução do NBT^{2+} , com uma consequente diminuição da taxa de aumento da absorvância a 560 nm (Valentão *et al.*, 2001; Magalhães *et al.*, 2008).

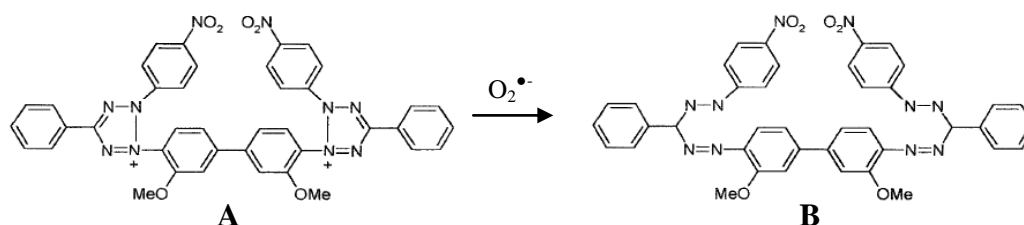


Figura 3.4 - Redução do NBT^{2+} (A) pelo radical anião superóxido, dando origem ao azul de formazano (B), que pode ser doseado espectrofotometricamente a 560 nm.

Em condições aeróbias, o radical anião superóxido pode ser gerado utilizando o sistema metossulfato de fenazina (PMS)/NADH em que, o PMS após ser reduzido pelo NADH, reage com o oxigénio produzindo o radical anião superóxido (Figura 3.5) (Nakamura *et al.*, 1992). Tendo em conta que o radical anião superóxido resulta da redução do oxigénio molecular e pode surgir no decurso de diversos processos metabólicos, uma das vantagens deste ensaio é a de se utilizar um oxidante com relevância fisiológica (Magalhães *et al.*, 2008).

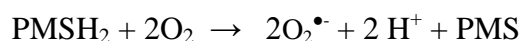


Figura 3.5 - Formação do radical anião superóxido através do sistema PMS/NADH (Nakamura *et al.*, 1992).

A capacidade das amostras para sequestrar o radical anião superóxido foi avaliada de acordo com o método descrito por Valentão e colaboradores (2001), com pequenas adaptações. Assim, em cuvetes do espectrofotómetro adicionaram-se 200 µL de cada uma das amostras. Em seguida adicionaram-se 300 µL de NADH 1,66 mM em tampão fosfato (19 mM, pH 7,4), 300 µL de NBT²⁺ 430 µM em tampão fosfato (19 mM, pH 7,4) e, por fim, tampão fosfato (19 mM, pH 7,4) para completar a 2 950 µL. A reação iniciou-se com a adição de 50 µL de PMS 162 µM em tampão fosfato (19 mM, pH 7,4) tendo-se acompanhado a variação da absorvância a 560 nm, durante dois minutos à temperatura ambiente. A estabilidade do NBT²⁺ em presença das amostras foi verificada, através da observação da estabilidade da absorvância a 560 nm antes da adição do PMS, como forma de garantir que as amostras em si não tinham capacidade de reduzir o NBT²⁺ a formazano. Realizou-se, igualmente, um ensaio controlo substituindo a amostra por igual volume de solvente da amostra (água). As determinações foram realizadas em quadruplicado, no espectrofotómetro (SPEKOL 1500). A percentagem de inibição da redução do NBT²⁺ de cada uma das amostras foi calculada, em relação ao controlo, utilizando a seguinte expressão:

$$\% \text{ Inibição} = [(\text{Variação}_{\text{absorvância do controlo}} - \text{Variação}_{\text{absorvância da amostra}}) / (\text{Variação}_{\text{absorvância do controlo}}) \times 100]$$

3.7.4. Determinação da capacidade de redução do Cu(II) pelo ensaio CUPRAC (“Cupric Reducing Antioxidant Capacity”)

O ensaio CUPRAC consiste na redução do Cu(II) para Cu(I) por ação de redutores (antioxidantes) presentes numa amostra. Ao contrário da forma oxidada (Cu(II)-neocuproína), a forma reduzida do complexo Cu-neocuproína (Cu(I)-neocuproína) apresenta uma coloração intensa com um máximo de absorção a 450 nm (Figura 3.6). Assim, a redução da forma oxidada deste complexo (Cu(II)-neocuproína) pelos compostos da amostra pode ser determinada espectrofotometricamente através da leitura da absorvância a 450 nm (Apak *et al.*, 2004). O complexo Cu(II)-neocuproína é estável e responde tanto a antioxidantes hidrofílicos como lipofílicos (Bektasoglu *et al.*, 2006). Os protões libertados na reação entre os polifenóis e este complexo, são tamponados por uma solução de acetato de amónio (Apak *et al.*, 2004).

Embora os iões Cu²⁺ estejam estequiometricamente em excesso em relação à neocuproína, deslocando o equilíbrio redox para a direita (Figura 3.6), o agente oxidante é o complexo Cu(II)-neocuproína e não o ião Cu²⁺, uma vez que o potencial padrão de redução do par Cu(II/I)-neocuproína (0,60 V) é muito superior ao do par Cu²⁺/Cu⁺ (0,17 V). Em resultado, os polifenóis são oxidados muito mais rapidamente e eficientemente com complexo do que com

Cu^{2+} , e a quantidade do complexo Cu(I)–neocuproína que surge no final da reação redox é equivalente à do reagente Cu(II)–neocuproína (Apak *et al.*, 2007).

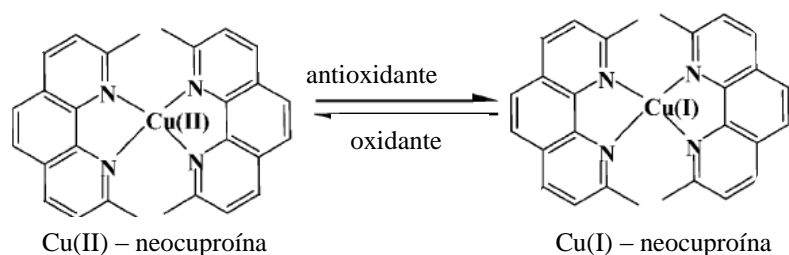


Figura 3.6- Redução do complexo Cu(II) – neocuproína a Cu(I) – neocuproína, por ação dos antioxidantes da amostra (adaptado de Apak *et al.*, 2004).

A realização do ensaio CUPRAC foi efetuada de acordo com o método descrito por Apak e colaboradores (2004) com algumas adaptações. Assim, num tubo de ensaio juntou-se 1 mL de cada uma das seguintes soluções: cloreto de cobre (II) bihidratado 10 mM, acetato de amónio 1M, neocuproína 7,5 mM em etanol. Em seguida, adicionou-se 50 μL de amostra e completou-se a 4100 μL com água. Os tubos foram incubados, ao abrigo da luz, durante 1 hora à temperatura ambiente, procedendo-se então à leitura da absorvância (espectrofotómetro SPEKOL 1500) a 450 nm, utilizando como branco a mesma mistura com 1,1 mL de água em vez da amostra. As amostras foram analisadas em quadruplicado tendo a atividade antioxidante sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por 1,1 mL das soluções padrão de ácido ascórbico (15,625; 31,25; 62,5; 125; e 250 μM). Os resultados foram expressos em mmol equivalentes de ácido ascórbico/100 g de peso fresco de mirtilo.

3.7.5. Determinação da atividade de redução do Fe(III) pelo ensaio FRAP (“Ferric Reduction Antioxidant Power”)

O ensaio FRAP baseia-se na determinação da capacidade da amostra para reduzir o Fe(III) a Fe(II), medindo assim a sua capacidade redutora. Em meio ácido, o complexo de Fe(III)-tripiridiltiazina (Fe^{3+} -TPTZ) é reduzido a Fe(II)-tripiridiltiazina (Fe^{2+} -TPTZ), por ação de antioxidantes dadores de eletrões presentes na amostra (Figura 3.7). Esta redução pode ser detetada pelo desenvolvimento de uma intensa coloração azul suscetível de ser quantificada espectrofotometricamente a 593 nm e que é proporcional à quantidade de espécies redutoras presentes na amostra (Benzie e Strain, 1996).

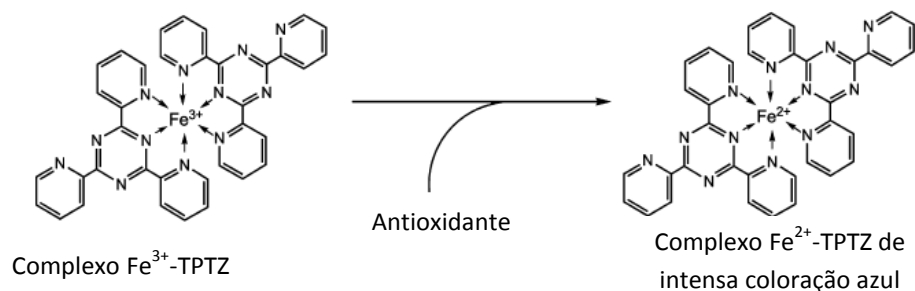


Figura 3.7- Formação do complexo (Fe^{2+} -TPTZ) após redução do Fe^{3+} por um antioxidante (adaptado de Moon e Shibamoto, 2009).

Para a realização do ensaio FRAP seguiu-se o método descrito por Ramful e colaboradores (2010), com algumas modificações. O reagente FRAP preparou-se no momento da utilização, adicionando 25 mL de tampão acetato 0,25 M (pH 3,6), 2,5 mL de TPTZ (10 mM) em HCl (40 mM) e 2,5 mL de cloreto de ferro (III) ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20 mM). O ensaio iniciou-se com a adição, num tubo de ensaio, de 3,0 mL do reagente FRAP, preparado de fresco e pré-aquecido a 37° C, com 300 μL de água e 100 μL de cada um dos extratos. As misturas foram incubadas no escuro, durante 4 minutos, a 37 °C. Durante esta incubação foi possível observar o aparecimento de uma coloração azul, cuja intensidade variava entre as várias amostras, e que foi quantificada por leitura da absorvância a 593 nm num espectrofotômetro (SPEKOL 1500) utilizando como branco a absorvância do reagente FRAP.

A diferença entre a absorvância da amostra e a absorvância do branco foi determinada e usada para calcular o valor de FRAP. As amostras foram analisadas em quadruplicado, tendo a atividade antioxidante sido determinada por interpolação de uma reta de calibração, preparada da forma já descrita para as amostras, mas substituindo as amostras por soluções de sulfato ferroso com concentrações entre os 0 e os 1,25 mM. Os resultados foram expressos em mmol de Fe^{2+} / 100 g de peso fresco de mirtilo.

3.7.6. Análise do resgate do radical peroxilo pelo ensaio ORAC (“Oxygen Radical Absorbance Capacity”)

O ensaio ORAC mede a capacidade da amostra para inativar o radical peroxilo, produzido pelo 2,2'-Azobis(2-metilpropionamida) dihidroclorato (AAPH) a 37 °C (Figura 3.8). Esta capacidade é avaliada através da determinação da inibição da oxidação da fluoresceína induzida por estes radicais. Uma vez que os produtos resultantes da oxidação da fluoresceína não são fluorescentes, a incubação deste fluorômetro na presença de uma fonte de radicais peroxilo leva a uma diminuição imediata da fluorescência. Quando esta incubação se processa na presença de um antioxidante estes podem desativar o radical peroxilo, por transferência de um átomo de hidrogênio, verificando-se um período de latência antes de se iniciar a diminuição da fluorescência. Esse período de latência é tanto maior quanto maior for a capacidade antioxidante da amostra e pode ser medido pela área sob a curva de decaimento da fluorescência da fluoresceína ao longo do tempo (Figura 3.9) (Ou *et al.*, 2001).

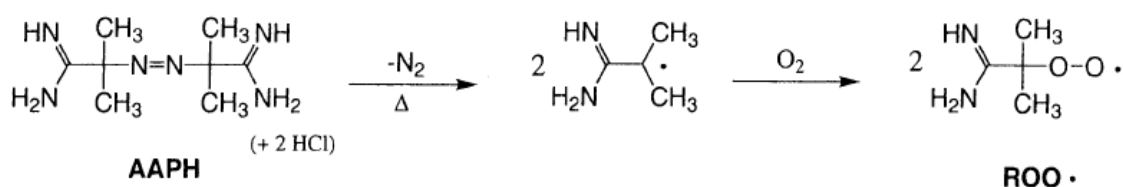


Figura 3.8 – Reação de oxidação do AAPH (Dunlap *et al.*, 2003).

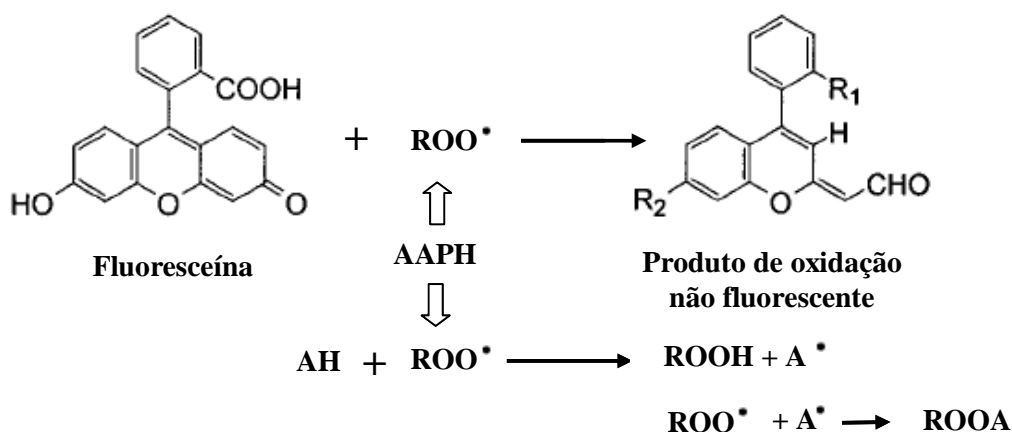


Figura 3.9 - Esquema das reações elementares ocorridas no ensaio ORAC. O AAPH produz os radicais peroxilo que oxidam a fluoresceína. Na presença de um antioxidante (AH), este desativa o radical peroxilo, dando origem a compostos não reativos (ROOH e ROOA), ($\text{R}_1=\text{COOH}$ e $\text{R}_2=\text{OCOOH}$) (adaptado de Ou *et al.*, 2001 e Prior *et al.*, 2005).

Para a realização do ensaio ORAC seguiu-se o método descrito por Ou e colaboradores (2001) com algumas modificações, tendo todas as determinações sido efetuadas em triplicado. As misturas reacionais, compostas por 20 µL das diferentes amostras diluídas em tampão fosfatos (75 mM, pH 7,4), 20 µL de diluições de trolox (entre 0,781 e 50 µM em tampão fosfatos 75 mM, pH 7,4) ou, no caso do branco, 20 µL de tampão fosfatos (75 mM, pH 7,4) e 160 µL de fluoresceína (0,075 µM em tampão fosfatos 75 mM, pH 7,4), foram preparadas em microplacas de 96 poços. Após as placas terem sido pré-incubadas durante cinco minutos a 37°C, iniciou-se a reação com a adição a cada poço de 20 µL de uma solução de AAPH (35,7 g/L em tampão fosfatos 75 mM, pH 7,4) pré-aquecida a 37 °C. As placas foram colocadas num leitor de microplacas (Anthos Zenyth 3100) e incubadas a 37 °C, com agitação durante 30 minutos, tendo a fluorescência (λ de excitação = 485 nm e λ de emissão = 535 nm) sido medida em intervalos de 1 minuto.

A área sob a curva (AUC) de decaimento da fluorescência da fluoresceína ao longo do tempo foi calculada recorrendo à seguinte expressão (Ou *et al.*, 2001):

$$AUC = 1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + f_3/f_0 + \dots + f_{30}/f_0$$

Sendo f_0 a f_{30} a fluorescência registada no minuto zero (f_0) e nos outros minutos, até ao minuto 30.

A atividade antioxidante, expressa em µmol de equivalentes de trolox por grama de peso fresco de mirtilos, foi quantificada por interpolação de uma reta de regressão linear entre os valores das concentrações de trolox e a área sob a curva de decaimento da fluoresceína obtida com as diversas concentrações de trolox testadas, após a subtração da área obtida no ensaio em branco.

3.8. Avaliação da atividade mutagénica e antimutagénica através do Teste de Ames

O teste de Ames ou “bacterial reverse mutagenicity test”, desenvolvido por Bruce Ames em 1975, deteta o potencial mutagénico de substâncias através da indução da mutação reversa no operão histidina em mutantes de *Salmonella typhimurium* LT2. Este teste é um dos testes de curto termo mais utilizados em toxicologia genética para determinar a mutagenicidade de compostos puros ou de misturas complexas, como, por exemplo, extratos obtidos a partir de alimentos (Maron e Ames, 1983).

O teste de Ames utiliza estirpes de *Salmonella typhimurium* com diferentes mutações em vários genes do operão histidina, e que, por isso, se encontram impedidas de sintetizar este aminoácido (*his⁻*). Quando estas estirpes crescem num meio de cultura sem histidina (meio mínimo contendo apenas sais minerais e uma fonte de carbono e azoto), apenas uma pequena percentagem de células, característica de cada estirpe, é capaz de reverter espontaneamente a mutação e tornar-se prototrófica para a histidina (*his⁺*), conseguindo, por isso, crescer e formar colónias. A exposição destas estirpes a agentes mutagénicos conduz a um aumento da taxa de reversão da mutação e, conseqüentemente, a um aumento do número de células prototróficas para a histidina. Assim, quando um mutagénico é adicionado ao meio, o número de revertentes aumenta proporcionalmente à dose de mutagénico utilizado (revisto em Mortelmans e Zeiger, 2000).

A realização do teste consiste em adicionar uma quantidade fixa de bactérias (cerca de 10^8) com quantidades variáveis do composto a testar e em plaquear estas misturas em meio de cultura contendo uma quantidade mínima e limitante de histidina (geralmente 0,05 mM). As placas são incubadas a 37 °C, durante 48 h, sendo, então, contado o número de colónias de revertentes. A baixa concentração de histidina no meio permite que as bactérias se dividam um número limitado de vezes, de modo a que as lesões que tenham ocorrido no DNA possam ser fixadas em mutações. Durante o crescimento surge na placa uma turvação característica (“background”) visível a olho nu, que pode funcionar como um indicador de citotoxicidade, uma vez que a sua ausência indica que o composto em estudo levou a uma morte celular generalizada. Quando a histidina do meio se esgota, apenas as bactérias que reverteram a mutação, bactérias que passaram a *his⁺*, conseguem continuar a crescer formando colónias isoladas (revisto em Mortelmans e Zeiger, 2000).

Os resultados são expressos em termos de número de revertentes/placa ou número de revertentes/quantidade de substância testada (revisto em Mortelmans e Zeiger, 2000). Um composto é considerado positivo no teste de Ames quando se obtém um efeito consistente de dose-resposta, isto é, quando se observa um aumento do número de revertentes com o aumento da concentração e, simultaneamente, quando para uma das doses estudadas se observa uma duplicação do número de revertentes espontâneos. A atividade mutagénica específica pode ser calculada pelo declive da parte linear da curva de dose-resposta.

3.8.1. Caracterização da estirpe de *S. typhimurium* utilizada

No presente trabalho utilizou-se a estirpe TA100 de *S. typhimurium* gentilmente cedida pelo Departamento de Genética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa.

Trata-se de uma estirpe com uma mutação por substituição de base, na qual o códon CTC da estirpe selvagem foi substituída por CCC no alelo *hisG46*. Para além desta mutação no operão da histidina, a estirpe TA100 exhibe outras características genotípicas adicionais que aumentam a sua sensibilidade para a deteção de mutágenos. Estas mutações adicionais incluem a mutação *rfa*, que causa a perda parcial da barreira lipopolissacárida aumentando a permeabilidade da parede celular bacteriana a moléculas de grande dimensão; A deleção *uvrB*, que corresponde a uma deleção do gene que codifica para uma das enzimas envolvidas no sistema de reparação de DNA por excisão; E a inserção do plasmídeo pKM101, que confere resistência à ampicilina, e que contém os genes de um sistema de reparação errónea, o que permite aumentar a frequência de mutação. A deleção *uvrB* abrange parte do gene que codifica para a biotina, o que torna esta estirpe incapaz de crescer na ausência desta vitamina. Esta estirpe apresenta um número de revertentes espontâneos que varia entre 150 e 210 (Maron e Ames, 1983; Mortelmans e Zeiger, 2000).

3.8.2. Realização dos testes de Ames

Para avaliar a atividade mutagénica e antimutagénica dos diferentes extratos de mirtilo estudados, procedeu-se à realização do teste de Ames, na variante de ensaio com pré incubação, conforme o descrito por Maron e Ames (1983). Foi preferida esta variante, pois ela permite aumentar a sensibilidade do teste, tendo em conta que as bactérias ficam expostas aos compostos em estudo durante algum tempo antes de efetuar a sua diluição na placa de Petri (Maron e Ames, 1983). Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

A estirpe TA100 foi inoculada em 5mL de meio NB, incubada durante 12 a 16 horas, a 37°C, com agitação (210 rpm) e ao abrigo da luz, numa incubadora orbital, tendo sido mantida ao abrigo da luz e à temperatura de 4 °C até à realização do ensaio.

Para a realização dos ensaios de mutagenicidade os diferentes volumes dos extratos analisados, entre 0 e 1000 µL, foram misturados com 250 µL de tampão de fosfatos de sódio (0,2 M, pH 7,4) e 100 µL da cultura bacteriana. Para que o volume final em todas as misturas de pré incubação fosse o mesmo, este foi sempre ajustado com água estéril até ao volume final de 1350 µL. As misturas assim preparadas foram incubadas a 37 °C e 210 rpm, durante 20 minutos, numa incubadora orbital. Após a incubação adicionou-se a cada tubo 2 mL de gelose de superfícies (“top-agar”) (Tabela 3.1) fundida a 100 °C e arrefecida até 45 °C. Esta mistura foi então agitada e plaqueada em placas de Petri com meio VB (Tabela 3.2). As placas foram incubadas invertidas em estufa, a 37 °C, durante 48 horas, procedendo-se então à contagem manual das colónias de revertentes *his*⁺, para cada concentração.

Tabela 3.1 - Composição da gelose de superfícies (por litro) (Maron e Ames, 1983).

Reagentes	Quantidade / Concentração
Agar	6 g
NaCl	5 g
Histidina	0,05 mM
Biotina	0,05 mM

Na preparação da gelose de superfície a histidina e a biotina foram adicionadas após esterilização da mistura de NaCl e agar, a partir de uma solução estéril e equimolar de histidina e de biotina (0,5 mM). Após esta suplementação a gelose de superfície foi imediatamente distribuída, em alíquotas de 2 mL, por tubos de vidro esterilizados.

Tabela 3.2- Composição do meio VB (por litro) (Maron e Ames, 1983).

Reagentes	Quantidade (g)
Glucose	20
Agar	15
K ₂ HPO ₄	10
NaH ₂ NH ₄ PO ₄ ·4H ₂ O	3,5
Ácido cítrico monohidratado	2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2

O meio VB resulta da mistura, após esterilização, de soluções de agar (1,5%), glucose (40%) e de uma solução de sais composta por MgSO₄·7H₂O (10 g/L), ácido cítrico monohidratado (100 g/L), K₂HPO₄ (500 g/L) e NaH₂NH₄PO₄·4H₂O (175 g/L).

Nos ensaios de atividade antimutagénica procedeu-se da mesma forma descrita para os ensaios de mutagenicidade, com a diferença que as misturas de pré incubação continham, simultaneamente, um volume fixo (10 µL) de uma solução de t-BHP (10 µg/µL,) preparada de fresco, por diluição em água estéril, a partir da respetiva solução comercial. Esta quantidade corresponde a uma concentração final de 1,11 µmol de t-BHP/placa. A atividade antimutagénica, expressa em percentagem de inibição da mutagenicidade, foi calculada através da seguinte expressão (Yen e Chen, 1995):

$$\% \text{Inibição} = [(RI-RE)-(RIM-RE)] \times 100/(RI-RE)$$

Sendo RI o número de revertentes induzidos pelo mutagénico, RE o número de revertentes espontâneos e RIM o número de revertentes induzidos pelo mutagénico na presença dos extratos em estudo.

3.9. Análise estatística dos resultados

Para efectuar o tratamento estatístico dos resultados efectuou-se o teste t-student recorrendo à utilização do “software” Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, Washington).

4. Resultados e discussão

A capacidade antioxidante é influenciada pelo solvente e pela técnica de extração utilizada, bem como pelo binómio tempo-temperatura. No que se refere aos solventes orgânicos, o metanol, por conseguir extrair elevada quantidade de compostos bioativos, tem sido apontado como o mais efetivo (Oliveira *et al.*, 2009). Assim, neste trabalho, foi utilizada uma solução de metanol acidificada como solvente extrator. No entanto, tendo em conta que era também objetivo do estudo avaliar a atividade antimutagénica dos extratos, através da realização do teste de Ames, foi necessário proceder à evaporação do solvente extrator, para posteriormente se ressuspender o resíduo em água ultrapura e esterilizar o extrato aquoso por filtração, em câmara de fluxo laminar, usando membranas estéreis com poro de 0.22 µm.

4.1. Determinação do teor de sólidos solúveis (grau Brix), fenóis e antocianinas totais

Os valores de grau Brix, compostos fenólicos e antocianinas totais das diversas variedades de mirtilo estudadas encontram-se na tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Teor de sólidos solúveis (grau Brix) e em fenóis e antocianinas totais, expresso por 100 g de peso fresco, das cultivares em estudo.

Amostras	Grau Brix (%)	Fenóis Totais (mg eq ácido gálico/100g)	Antocianinas Totais (mg eq cianidina/100 g)
O'Neal	15,5 ^{a,b} ± 2,7	141 ^a ± 2	36,3 ^a ± 0,3
Star	13,2 ^a ± 1,2	170 ^b ± 2	52,4 ^b ± 0,9
Georgia Gem	17,2 ^b ± 1,9	142 ^a ± 2	16,1 ^c ± 0,1
Sharpblue	18,2 ^b ± 2,7	220 ^c ± 2	57,1 ^d ± 0,3
Misty	14,3 ^a ± 0,6	138 ^d ± 1	20,4 ^e ± 0,3
Jubilee	15,9 ^b ± 1,1	194 ^e ± 2	43,2 ^f ± 0,3

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t (p<0,05).

Os valores de grau Brix variaram entre 13,2%, para a variedade Star, e 18,2%, para a variedade Sharpblue, e encontram-se dentro das gamas reportadas por outros autores (entre 10 e 19) para diversas cultivares de *V. corymbosum* na altura da plena maturação (Prior *et al.*, 1998; Giovanelli e Buratti, 2009). O facto de todas as plantas terem estado sujeitas aos mesmos fatores

de cultivo (mesma localização e ano de produção) elimina os efeitos de diferenças climáticas, níveis de radiação UV, temperatura ambiente, “stress” hídrico, composição do solo e disponibilidade de fatores nutricionais. Todas as amostras foram, igualmente, colhidas com o grau de maturação adequado à sua comercialização, transportadas para o laboratório e analisadas em iguais condições. Assim, as diferenças observadas devem-se principalmente a diferenças genéticas entre as diferentes cultivares.

Por análise da tabela 4.1 verifica-se que o teor de fenóis totais variou entre 138, para a variedade Misty, e 220 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de peso fresco para a variedade Sharpblue. Estes valores estão de acordo com os valores apresentados por Koca e Karadeniz (2009) para mirtilos de outras variedades, cultivados na região do mar negro, na Turquia, e com os valores reportados por Ehlenfeldt e Prior (2001) para as mesmas variedades de mirtilos, cultivadas em Nova Jersey, nos Estados Unidos da América. Neste último estudo os valores variaram entre 117 para a variedade Star e 195 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de peso fresco, para a variedade Sharpblue. Outros autores descrevem teores de fenóis totais superiores aos obtidos neste trabalho, chegando a ser superiores a 300 mg ácido gálico/100 g de fruto, em outras cultivares de *V. corymbosum*, especialmente para variedades dos grupos “Rabbiteye” e “Northern Highbush”, sendo ainda mais elevados, superiores a 500 mg ácido gálico/100 g de fruto, em mirtilos selvagens (Prior *et al.*, 1998; Ehlenfeldt e Prior, 2001; Giovanelli e Buratti, 2009; Koca e Karadeniz, 2009; You *et al.*, 2011).

O teor em antocianinas monoméricas totais variou entre os 16,1 para a variedade Georgia Gem, e os 57,1 mg equivalentes de cianidina/100 g de peso fresco para a variedade Sharpblue (Tabela 4.1). Para as variedades Star e Sharpblue os valores obtidos foram idênticos aos obtidos, por outros autores, para as mesmas variedades de mirtilos cultivadas em Nova Jersey, nos Estados Unidos da América, no entanto, para as restantes variedades os valores foram bastante (33 a 75%) inferiores (Ehlenfeldt e Prior, 2001). Outros autores, estudando outras cultivares de *V. corymbosum*, obtiveram valores de antocianinas monoméricas totais superiores aos obtidos neste trabalho, variando entre 92 e 126 mg equivalentes de cianidina/100 g de mirtilo (Prior *et al.*, 1998; Connor *et al.*, 2002; Giovanelli e Buratti, 2009). Nesses trabalhos, realizados com múltiplas cultivares *V. corymbosum*, as antocianinas representam aproximadamente 30 a 60% dos fenóis totais. No entanto, nos mirtilos analisados as antocianinas representaram 11% dos fenóis totais na cultivar Geórgia Gem, 15% na Misty, 22% na Jubilee, 26% na O’Neal e Sharpblue e 31% na Star, ou seja, de um modo geral, as antocianinas representaram um peso mais baixo nos fenóis totais do que aquilo que é reportado por outros autores (Prior *et al.*, 1998; Ehlenfeldt e Prior, 2001; Giovanelli e Buratti, 2009). Este teor mais baixo em antocianinas pode dever-se, nuns casos, a diferenças genéticas das cultivares e, em todos os casos, a fatores climáticos e ambientais, tais como, a temperatura, a radiação UV, o tipo de solo ou as técnicas

agrícolas aplicadas, pois sabe-se que podem influenciar a síntese das antocianinas (Koca e Karadeniz, 2009). Por exemplo, a simples diferença entre o cultivo em modo convencional e biológico pode levar a um diferente perfil em antocianinas em mirtilos da mesma variedade (You *et al.*, 2011).

Tal como verificado com o teor em fenóis totais, também em relação às antocianinas se verifica que os mirtilos selvagens apresentam teores muito superiores aos das variedades cultivadas (cerca 350 mg de cianidina/100 g), encontrando-se presentes quer na polpa quer na epiderme do fruto pois, ao contrário das variedades cultivadas, a polpa dos mirtilos selvagens tem, igualmente, uma coloração avermelhada (Giovanelli e Buratti, 2009).

Com o objetivo de estabelecer relações entre diversos constituintes das amostras foram efetuadas várias correlações lineares. Assim, foram determinadas as equações das retas que melhor se ajustavam aos vários pontos experimentais obtidos e foi determinado o respetivo coeficiente de correlação linear de Pearson (r). Este coeficiente mede a intensidade da associação linear existente entre as variáveis e pode tomar valores entre -1 e 1 (Tabela 4.2).

Tabela 4.2- Classificação da correlação em função do valor do coeficiente de correlação de Pearson (Santos, 2007).

Coeficiente de Pearson (r)	Tipo de correlação
$r = 1$	Perfeitamente positiva
$0,8 \leq r < 1$	Fortemente positiva
$0,5 \leq r < 0,8$	Moderadamente positiva
$0,1 \leq r < 0,5$	Fracamente positiva
$0 < r < 0,1$	Infimamente positiva
$r = 0$	Nula
$-0,1 < r < 0$	Infimamente negativa
$-0,5 < r \leq -0,1$	Fracamente negativa
$-0,8 < r \leq -0,5$	Moderadamente negativa
$-1 < r \leq -0,8$	Fortemente negativa
$r = -1$	Perfeitamente negativa

Na Tabela 4.3 apresentam-se os valores do coeficiente de Pearson para as correlações entre os teores de fenóis totais, antocianinas monoméricas totais e teores de sólidos solúveis totais dos diferentes extratos de mirtilo. Assim, verificou-se a existência de uma correlação fortemente positiva entre o teor de fenóis e o teor de antocianinas e fracamente positiva entre o teor de

fenóis totais e o teor de sólidos solúveis totais (°Brix). Por sua vez, a correlação entre o teor de antocianinas e o teor de sólidos solúveis totais é infimamente positiva.

Tabela 4.3- Coeficiente de Pearson para as correlações entre fenóis totais, antocianinas monoméricas totais e sólidos solúveis totais (°Brix).

	<i>Fenóis^a</i>	<i>Antocianinas^b</i>	<i>°Brix^c</i>
<i>Fenóis^a</i>	1		
<i>Antocianinas^b</i>	0,820498	1	
<i>°Brix^c</i>	0,475145	0,036352358	1

a) mg eq. ácido gálico/100 g de mirtilos; b) mg eq. cianidina/100 g de mirtilos; c) %.

Desta forma, verifica-se que o grau Brix parece variar de forma independente quer do teor em fenóis, quer, em particular, do teor em antocianinas, enquanto que, o teor em fenóis totais e em antocianinas variam de uma forma dependente. Comparando os teores em sólidos solúveis totais, fenóis totais e antocianinas monoméricas totais das seis variedades estudadas (Figura 4.1), verifica-se que a variedades Sharpblue é a que mais se destaca pela positiva, ao possuir os teores mais elevados de todos os parâmetros analisados.

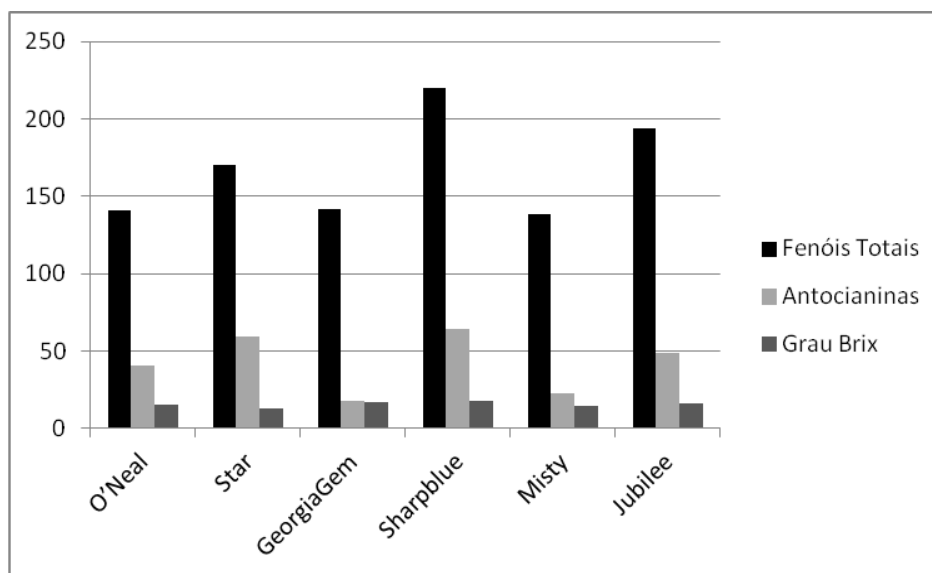


Figura 4.1 – Teor em fenóis totais (mg eq ácido gálico/100 g), antocianinas monoméricas totais (mg equivalentes cianidina/100 g) e grau Brix (%) nas cultivares de mirtilo em estudo.

4.2. Determinação da capacidade antioxidante

4.2.1. Determinação da capacidade de quelação do ferro

Os íons Fe^{2+} são o pró-oxidante mais forte entre os íons metálicos. Estes íons podem gerar espécies reativas de oxigênio ao reagirem com o peróxido de hidrogênio ou com hidroperóxidos lipídicos, através das reações de Fenton. Os íons Fe^{3+} também produzem radicais a partir dos peróxidos. No entanto, a sua taxa de produção é 10 vezes inferior à dos íons Fe^{2+} (Gülçin, 2006b). Desta forma, a capacidade de quelação deste metal pode ser encarada como um mecanismo de atividade antioxidante (Geckil *et al.*, 2005).

Dependendo da sua estrutura, os compostos fenólicos têm maior ou menor afinidade química para com os cátions dos metais de transição, tendo, assim, capacidade para os complexar, tornando-os indisponíveis para participar nas reações de Fenton (Dorman *et al.*, 2004). A quelação de metais, que em princípio constitui uma característica positiva dos compostos fenólicos, uma vez que pode contribuir para a redução do “stress” oxidativo, pode, igualmente, acarretar um lado menos positivo quando contribui para a redução da absorção digestiva de diversos elementos minerais essenciais (Ferguson, 2001).

Esta característica dos polifenóis faz com que extratos preparados a partir de alimentos com elevada concentração destes compostos possam, igualmente, apresentar capacidade de quelação de íons metálicos. Com efeito, extratos de plantas aromáticas, como os orégãos, a satureja, o tomilho e a hortelã (Dorman *et al.*, 2003 e 2004), extratos de própolis (Geckil *et al.*, 2005) ou de bagas de zimbro (Miceli *et al.*, 2009) têm mostrado capacidade de quelação de Fe(II) .

No entanto, nos extratos de mirtilos analisados no presente trabalho não foi possível detetar nenhuma quelação do Fe(II) , uma vez que não se verificou inibição da formação dos complexos entre o Fe(II) e a ferrozina, com nenhuma das amostras testadas, até uma concentrações de 50 mg/mL. Este resultado pode ser devido à estrutura química dos compostos fenólicos presentes nos extratos de mirtilos.

4.2.2. Determinação da atividade antioxidante por mecanismo de transferência eletrônica: ensaios FRAP e CUPRAC

Foram realizados dois ensaios, o ensaio FRAP e CUPRAC, para avaliar a capacidade antioxidante por mecanismo de transferência eletrônica das diferentes amostras de mirtilos. O ensaio FRAP é um dos testes mais rápidos e úteis para análises de rotina, permitindo a análise de muitas amostras em pouco tempo (Pantelidis *et al.*, 2007). O ensaio CUPRAC tem, em relação ao ensaio FRAP, as vantagens de se realizar a um pH com maior significado fisiológico (pH 7 contra pH 3,6), de conseguir detetar antioxidantes do tipo tiol, como a glutathiona ou a cisteína, uma vez que a configuração eletrônica do ião Cu(II) lhe permite uma cinética redox mais rápida do que a do ião Fe(III). Por outro lado, o facto do potencial redox para o par Cu(II) - neocuproína / Cu(I) - neocuproína ser inferior ao do Fe(III) / Fe(II) com os respetivos ligandos do FRAP faz com que determinados compostos, tais como açúcares simples ou o ácido cítrico, não possam ser reduzidos no ensaio CUPRAC podendo-o ser no ensaio FRAP (Apak *et al.*, 2004).

Os resultados dos ensaios FRAP e CUPRAC obtidos com as diferentes amostras de mirtilos em estudo encontram-se na tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Valores obtidos nos ensaios FRAP e CUPRAC.

Amostras	Valor FRAP	Valor CUPRAC
	(mmol Fe ²⁺ /100 g)	(mmol eq de ácido ascórbico/100 g)
O'Neal	1,19 ^a ± 0,01	0,99 ^a ± 0,01
Star	1,49 ^b ± 0,02	1,27 ^b ± 0,02
Georgia Gem	1,10 ^c ± 0,03	1,07 ^c ± 0,01
Sharpblue	1,91 ^d ± 0,03	1,70 ^d ± 0,03
Misty	1,04 ^e ± 0,02	0,99 ^a ± 0,01
Jubilee	1,62 ^f ± 0,04	1,52 ^e ± 0,03

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t (p<0,05).

Por análise da tabela 4.4 verifica-se que a atividade antioxidante por redução do ferro férrico, ensaio FRAP, variou entre 1,04 mmol Fe²⁺/100 g na cultivar Misty e 1,91 mmol Fe²⁺/100 g de mirtilos na cultivar Sharpblue. Para este ensaio, todas as cultivares apresentaram valores significativamente diferentes entre si, de acordo com o teste t. Os valores de FRAP aproximaram-se dos valores reportados por Koca e Karadeniz (2009) para outras variedades de mirtilos cultivados na região do mar negro, na Turquia, (entre 0,756 e 1,369 mmol Fe²⁺/100 g),

foram ligeiramente inferiores aos reportados por Giovaneli e Buratti (2009) para outras variedades de mirtilos cultivados em altitude no Norte da Itália (entre 2,13 e 2,64 mmol Fe^{2+} /100 g), sendo bastante inferiores aos verificados em mirtilos selvagens provenientes de diversas localizações (entre 3,4 e 5,7) (Giovaneli e Buratti, 2009; Koca e Karadeniz, 2009).

No que concerne ao ensaio CUPRAC, verificou-se que este valor variou entre os 0,99 mmol eq de ácido ascórbico/100 g nas cultivares O'Neal e Misty e 1,70 mmol eq de ácido ascórbico/100 g de mirtilos na cultivar Sharpblue. À exceção das cultivares O'Neal e Misty, que registaram o mesmo valor, em todas as outras cultivares os valores obtidos foram significativamente diferentes entre si.

A tabela 4.4, bem como a figura 4.2, permitem verificar que, com exceção da variedade O'Neal, os valores de FRAP e CUPRAC de todas as outras amostras variaram no mesmo sentido, ou seja, em ambos os ensaios os valores de FRAP e CUPRAC foram aumentando pela seguinte ordem: Misty, Geogia Gem, Star, Jubilee e Sharpblue. Esta observação aponta no sentido dos compostos responsáveis por ambas as atividades serem os mesmos.

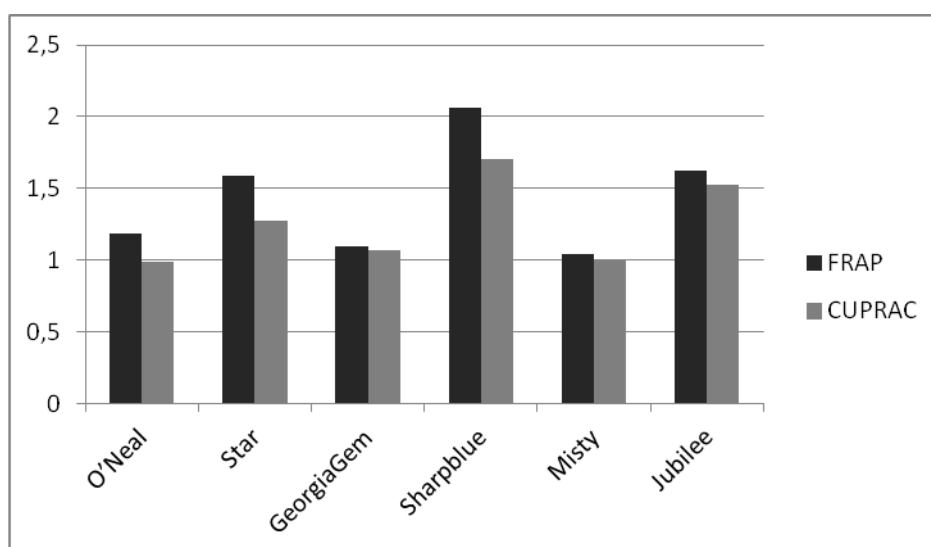


Figura 4.2 – Capacidade antioxidante das diferentes amostras nos ensaios FRAP (mmol Fe^{2+} /100 g) e CUPRAC (mmol eq de ácido ascórbico/100 g).

Com o objetivo de tentar estabelecer relações entre o grau Brix e a composição em compostos fenólicos das amostras estudadas e as respectivas atividades de FRAP e CUPRAC efetuaram-se correlações lineares entre estes vários parâmetros (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 - Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição em fenóis totais e antocianinas totais e as atividades FRAP e CUPRAC.

	<i>Fenóis^a</i>	<i>Antocianinas^b</i>	<i>°Brix^c</i>	<i>CUPRAC^d</i>	<i>FRAP^e</i>
<i>CUPRAC^c</i>	0,9954	0,7777	0,4967	1	
<i>FRAP^d</i>	0,9876	0,8960	0,3999	0,9733	1

a) mg eq ácido gálico/100 g; b) mg eq cianidina/100 g; c) %; d) mmol eq ácido ascórbico/100 g; e) mmol Fe²⁺/100 g.

Foi possível verificar a existência de correlações fracamente positivas entre o grau Brix e os ensaio FRAP ($r = 0,3999$) e CUPRAC ($r = 0,4967$) e fortemente positivas entre o teor em fenóis totais e a capacidade antioxidante pelos ensaios CUPRAC ($r = 0,9954$) e FRAP ($r=0,9876$), entre o teor de antocianinas e a capacidade antioxidante pelo ensaio FRAP ($r=0,8960$), bem como entre a capacidade antioxidante pelos ensaios CUPRAC e FRAP ($r=0,9733$). Entre o teor em antocianinas e os valores do ensaio CUPRAC a correlação foi moderadamente positiva ($r = 0,7777$). Assim, verifica-se que as amostras com teores mais elevados em fenóis são aquelas que apresentam valores de FRAP e de CUPRAC mais elevados, o que sugere que as atividades FRAP e CUPRAC dos mirtilos se devam principalmente aos seus compostos fenólicos. A existência de correlações fortemente positivas entre o ensaio FRAP e os teores em fenóis e em antocianinas foi igualmente verificada por outros autores (Giovaneli e Buratti, 2009; Koca e Karadeniz, 2009). Tal como verificado no presente estudo, também estes autores, verificaram uma maior linearidade na relação do ensaio FRAP com o teor em fenóis do que com o teor em antocianinas, o que se pode dever à existência de outros compostos fenólicos, especialmente flavonoides como a miricetina e a quercetina, que podem dar um importante contributo para a atividade FRAP detetada (Giovaneli e Buratti, 2009). A existência de uma correlação fortemente positiva entre os ensaios FRAP e CUPRAC aponta no sentido dos compostos responsáveis por estas duas atividades serem, na sua maioria, os mesmos.

4.2.3. Determinação da atividade antioxidante por sequestro de espécies reativas de oxigénio: peróxido de hidrogénio, radical anião superóxido e radical peroxilo (ensaio ORAC)

A capacidade das amostras em estudo para sequestrar espécies reativas de oxigénio foi avaliada em relação ao peróxido de hidrogénio, ao radical anião superóxido e em relação ao radical peroxilo (Tabela 4.6). O facto de todas estas espécies reativas de oxigénio se poderem formar *in vivo* confere, a todos estes ensaios, importante relevância fisiológica.

Tabela 4.6- Atividade antioxidante por sequestro de espécies reativas de oxigénio.

Amostras	% Sequestro de H ₂ O ₂	% Sequestro do anião	Valor ORAC
		superóxido	(μ mol eq trolox/g)
O'Neal	18,0 ^{a,e} \pm 2,8	93,9 ^a \pm 1,5	10,5 ^a \pm 0,9
Star	20,1 ^{a,c} \pm 1,8	93,7 ^a \pm 1,8	14,2 ^b \pm 0,8
Georgia Gem	11,5 ^b \pm 0,8	94,3 ^a \pm 0,5	14,4 ^b \pm 0,7
Sharpblue	22,5 ^c \pm 1,4	94,3 ^a \pm 0,8	17,3 ^c \pm 0,8
Misty	10,7 ^b \pm 1,6	92,9 ^a \pm 0,03	13,4 ^b \pm 0,5
Jubilee	16,0 ^e \pm 2,4	95,2 ^a \pm 0,4	14,0 ^b \pm 0,6

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t ($p < 0,05$).

Todas as amostras apresentaram capacidade para sequestrar as três espécies reativas de oxigénio em análise. A percentagem de sequestro do peróxido de hidrogénio para as diferentes cultivares analisadas variou entre 10,7%, para a cultivar Misty, e 22,5% para a cultivar Sharpblue. Em relação ao sequestro do radical anião superóxido, todas as variedades apresentaram elevada percentagem de sequestro não se tendo registado, nas condições experimentais utilizadas, diferenças significativas entre essas percentagens. Por último, os valores de ORAC, expressos em μ mol equivalente trolox/g de mirtilos, variaram entre 10,5 na cultivar O'Neal e 17,3 na Sharpblue. De um modo geral, os valores de ORAC obtidos aproximaram-se bastante dos valores reportados por Ehlenfeldt e Prior (2001) para as mesmas variedades de mirtilos, cultivadas em Nova Jersey, nos Estados Unidos da América. Destaca-se apenas a variedade Star, que apresentou um valor de ORAC quase duas vezes superior no presente ensaio. Contudo, esta comparação pode estar afetada de algum erro uma vez que, no ensaio realizado por Ehlenfeldt e Prior (2001), o composto fluorescente utilizado foi a R-ficoeritrina, enquanto que, no presente ensaio, foi a fluoresceína. Outros autores reportam valores de ORAC bastante mais elevados, valores até 55,7 μ mol de eq. trolox/g, para outras variedades de mirtilos (Prior *et al.*, 1998; Ehlenfeldt e Prior, 2001; You *et al.*, 2011). Nestes estudos, a diferença de valores de ORAC entre variedades chegou a ser superior a seis vezes, o que, segundo os mesmos autores, sugere que os níveis de compostos antioxidantes em mirtilos possam ser aumentados em posteriores melhoramentos genéticos da planta. Ehlenfeldt e Prior (2001) avaliaram ainda os valores da atividade ORAC em grainhas e películas de mirtilos, concluindo que a maioria dos compostos com atividade antioxidante se concentra na película.

Com o objetivo de tentar estabelecer relações entre o grau Brix, a composição em compostos fenólicos, as atividades de FRAP e CUPRAC e sequestro de espécies reativas de oxigénio efetuaram-se correlações lineares entre estes vários parâmetros (Tabela 4.7).

Tabela 4.7 - Coeficiente de Pearson para as correlações entre composição em fenóis totais e antocianinas totais e a atividade antioxidante dos vários extratos de mirtilo.

	Fenóis ^a	Antocianinas ^b	°Brix ^c	CUPRAC ^c	FRAP ^d	Sequestro H ₂ O ₂ ^e	Sequestro O ₂ ^{••e}	ORAC ^f
Sequestro H ₂ O ₂ ^e	0,7219	0,9526	0,1282	0,6653	0,8173	1		
Sequestro O ₂ ^{••e}	0,5875	0,3388	0,5569	0,6353	0,5645	0,2825	1	
ORAC ^f	0,7473	0,4018	0,5567	0,7640	0,6827	0,3250	0,2629	1

a) mg eq ácido gálico/100 g; b) mg eq cianidina/100 g; c) mmol eq ácido ascórbico/100 g; d) mmol Fe²⁺/100 g; e) %; f) µmol eq trolox/g.

Por análise da tabela 4.7, verifica-se que o grau Brix se encontra moderadamente correlacionado com as atividades de sequestro do radical anião superóxido e ORAC, não se encontrando correlacionado com o sequestro do peróxido de hidrogénio. Verificaram-se ainda correlações moderadamente positivas entre o teor em fenóis totais e o sequestro do radical peróxido ($r = 0,7473$), do peróxido de hidrogénio ($r = 0,7219$) e do radical anião superóxido ($r = 0,5875$). Da mesma forma, as correlações entre os ensaios FRAP e CUPRAC e os ensaios de sequestro foram fortemente positivas, no caso da correlação entre o ensaio FRAP e o sequestro do peróxido de hidrogénio ($r = 0,8173$), ou moderadamente positivas, em todos os restantes casos. Estes resultados sugerem o envolvimento dos compostos fenólicos em todas as atividades de sequestro, parecendo que as antocianinas desempenhem um papel particularmente importante no sequestro do peróxido de hidrogénio ($r = 0,9526$).

Em relação ao ensaio ORAC e ao sequestro do radical anião superóxido, verificou-se a existência de melhores correlações com os teores em fenóis totais do que com o teores de antocianinas, sugerindo que outros fenóis, que não as antocianinas, possam contribuir mais fortemente para estas duas atividades de sequestro. Prior e colaboradores (1998) e Ehlenfeldt e Prior (2001) verificaram igualmente a existência de melhores correlações entre os valores de ORAC e o teor em fenóis totais do que entre os valores de ORAC e os teores de antocianinas, sugerindo que o teor de fenóis totais possa ser um parâmetro útil de seleção de variedades com valores superiores de ORAC nos programas de melhoramento de plantas (Prior *et al.*, 1998). No entanto, em ensaios realizados com variedades “Rabbiteye”, foi possível obter, igualmente, correlações fortemente positivas entre o teor em antocianinas e o ensaio ORAC (You *et al.*, 2011).

Comparando os valores para os diferentes ensaios de atividade antioxidante, obtiveram-se correlações fortemente positivas entre os ensaios FRAP e sequestro de peróxido de hidrogénio ($r = 0,8173$), moderadamente positivas entre o ensaio CUPRAC e os ensaios ORAC, sequestro de peróxido de hidrogénio e sequestro do radical anião superóxido, bem como entre o ensaio FRAP e os ensaios ORAC e sequestro do radical anião superóxido. Entre os vários ensaios de sequestro as correlações obtidas foram sempre fracamente positivas, sugerindo que possam ser

compostos diferentes, particularmente fenóis diferentes, que mais contribuem para as atividades detetadas.

4.3. Avaliação da atividade antimutagénica

A atividade antimutagénica foi avaliada pela capacidade dos extratos, obtidos a partir das amostras, eliminarem a mutagenicidade do mutagénico químico oxidativo *tert*-butil-hidroperóxido (t-BHP), na estirpe TA100.

A curva de dose-resposta do t-BHP na estirpe TA100 encontra-se na figura 4.3. Com base nesta curva de dose-resposta escolheu-se a dose 1,11 μmol t-BHP/placa para efetuar os ensaios de atividade antimutagénica com os diferentes extratos de mirtilos, uma vez que era uma dose que leva a uma resposta positiva e que ainda se encontra na fase linear da curva de dose-resposta.

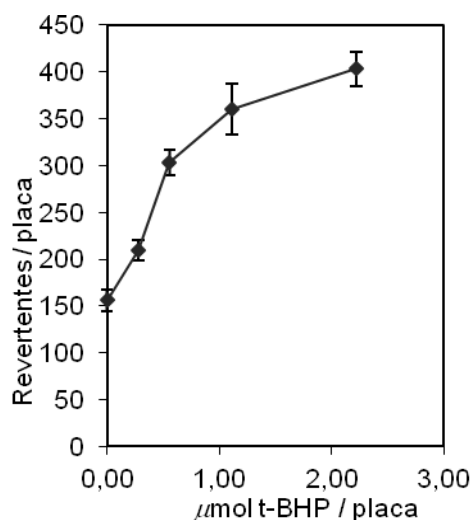


Figura 4.3 – Curva de dose-resposta do t-BHP com a estirpe TA100.

A figura 4.4 mostra o efeito dos diferentes extratos sobre a mutagenicidade do t-BHP na estirpe TA100.

Por análise da figura 4.4, verifica-se que, o número de revertentes espontâneos variou entre 153 e 161 e que, os extratos, quando testados isoladamente (curvas a cinzento —■—), não

apresentaram mutagenicidade na estirpe TA100, uma vez que não se verificou a duplicação do número de revertentes espontâneos em nenhuma das doses utilizadas. Refira-se que, para a estirpe utilizada, são esperados entre 150 a 210 revertentes espontâneos.

Os resultados obtidos mostram que os extratos de mirtilo inibem a atividade mutagénica do t-BHP (curvas a preto), uma vez que, para todos os extratos, o número de revertentes induzidos pelo mutagénico foi diminuindo à medida que se foi aumentando a dose de extratos na placa. Este último efeito foi, no entanto, menos visível no caso das cultivares Star (Figura 4.4 B) e Jubilee (Figura 4.4 F).

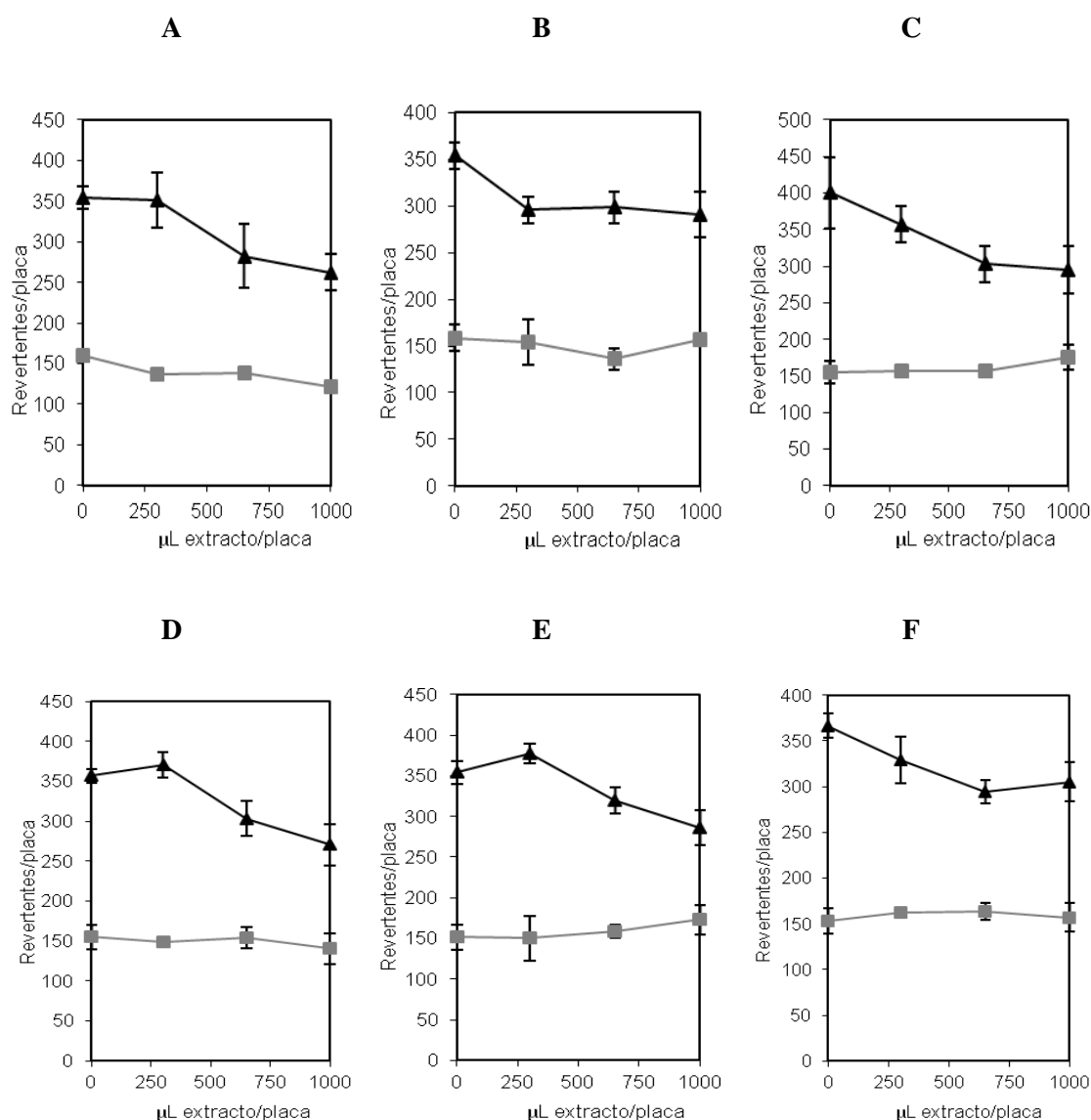


Figura 4.4 - Curvas de dose-resposta das diferentes variedades de mirtilos em estudo: A) O'Neal, B) Star, C) Georgia Gem, D) Sharpblue, E) Misty e F) Jubilee, na estirpe TA100, na ausência (—■—) e na presença (—▲—) de 1,11 µmol de t-BHP/placa.

O facto do número de revertentes nunca ter atingido valores inferiores aos revertentes espontâneos, em conjunto com a existência de patamares nas curvas de dose-resposta dos extratos na presença do mutagénico, aponta no sentido desta diminuição do número de revertentes por placa resultar de uma diminuição do número de revertentes induzidos pelo mutagénico, traduzindo efetivamente a existência de atividade antimutagénica dos extratos, não sendo o resultado de morte das bactérias devida a toxicidade aguda.

Na figura 4.5 encontram-se as percentagens de inibição da mutagenicidade do t-BHP obtidas com os diferentes volumes de extrato/placa e por cultivar ensaiados. Todas as variedades conseguiram inibir a mutagenicidade do t-BHP. As percentagens de inibição máximas variaram entre cerca de 35% para as variedades Star, Misty e Jubilee e cerca de 45% para as variedades O'Neal, Georgia Gem e Sharpblue. No entanto, dada a variação dos resultados, estas percentagens de inibição não foram significativamente diferentes de acordo com o teste t ($p < 0,05$).

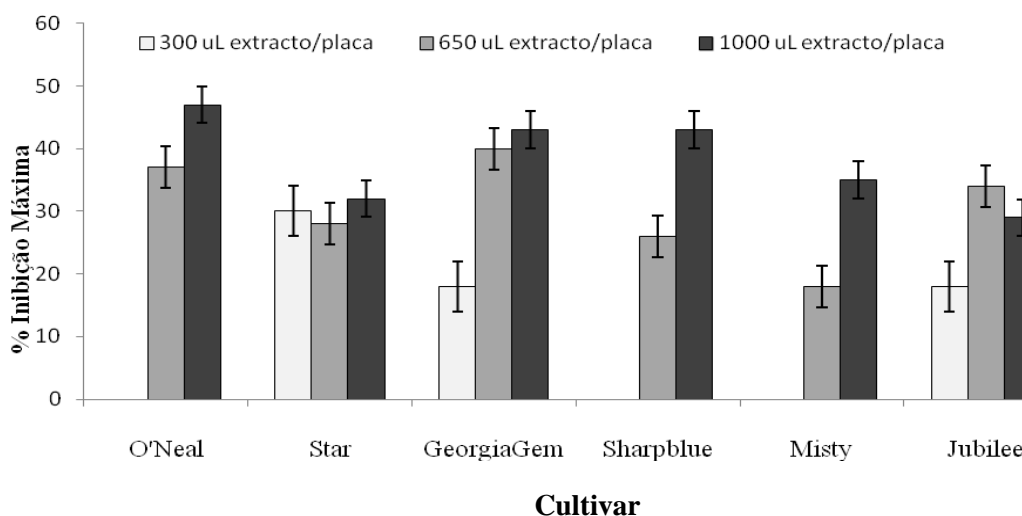


Figura 4.5- Percentagem de inibição da mutagenicidade do t-BHP, na estirpe TA100, com os extratos obtidos a partir das diferentes cultivares de mirtilo em estudo, nas diferentes doses testadas.

Assim, embora de forma moderada, uma vez que as percentagens de inibição não chegaram aos 50%, todas as variedades apresentaram atividade antimutagénica. Uma vez que não se verificaram diferenças significativas entre variedades, não se realizou nenhum ensaio de correlação nem com o teor em fenóis e antocianinas, nem com as atividades antioxidantes determinadas através dos diferentes ensaios.

5. Conclusões finais

Os mirtilos, assim como outros pequenos frutos, tais como as amoras ou as framboesas, têm vindo a ter um consumo cada vez mais elevado, em grande parte devido a serem considerados alimentos capazes de promover a saúde de quem os consome. Este aumento do consumo verifica-se não só nos frutos em natureza, mas também nos produtos transformados, tais como iogurtes, sumos ou bolachas, deles derivados.

A associação entre os mirtilos e a promoção da saúde tem vindo a ser sustentada por diversos trabalhos que comprovam, que extratos preparados a partir destes frutos, possuem diversas propriedades, como, por exemplo, propriedades antioxidantes ou antiinflamatórias, que podem ser responsáveis por esses efeitos benéficos sobre a saúde. Muitas destas atividades resultam do elevado teor em compostos fenólicos que estes frutos possuem. Apesar desse teor ser elevado na generalidade das variedades de mirtilos, é sabido que quer a quantidade, quer o perfil exato destes compostos, podem variar, não só, com a cultivar, como também com o clima, local de cultivo ou práticas agrícolas, podendo algumas destas diferenças ser resultado de diferentes graus de “stress” hídrico, da maior ou menor disponibilidade de nutrientes e da intensidade da radiação ultravioleta (Giovanelli e Buratti, 2009).

Assim, este trabalho teve por objetivo fazer um estudo comparativo do teor de fenóis totais, antocianinas e da atividade antioxidante e antimutagénica em seis diferentes cultivares de mirtilo do grupo “Southern Highbush” (O’Neal, Star, Georgia Gem, Sharpblue, Misty e Jubilee) produzidas em modo de cultivo biológico no Sul de Portugal, tentando avaliar a existência de diferenças significativas entre as cultivares resultantes dos seus diferentes genótipos. Tentou-se ainda estabelecer uma correlação entre o conteúdo em compostos fenólicos, em particular em antocianinas, e a atividade antioxidante das diferentes variedades.

Uma vez que não existe um método universal para a determinação da atividade antioxidante das amostras, visto esta poder ser exercida através de diferentes mecanismos, aplicaram-se diferentes ensaios, nomeadamente, ensaios de avaliação da capacidade redutora (FRAP e CUPRAC), da capacidade de sequestro de três das espécies reativas de oxigénio que podem formar-se *in vivo* (radical peróxido, peróxido de hidrogénio e radical anião superóxido) e a ainda da capacidade de quelação de Fe(II). O potencial antimutagénico foi avaliado através do estudo da capacidade destas variedades para inibirem a mutagenicidade do mutagénico oxidativo *tert*-butil-hidroperóxido (t-BHP).

O facto de todas as cultivares terem sido produzidas com a mesma técnica de cultivo, no mesmo ano e na mesma região, elimina os efeitos de diferenças climatéricas, níveis de radiação

UV, temperatura ambiente, “stress” hídrico, composição do solo e disponibilidade de fatores nutricionais. Da mesma forma, o facto de todas as variedades terem sido colhidas em estado de plena maturação, ou seja, com o grau de maturação adequado à sua comercialização, terem sido transportadas para o laboratório em iguais condições e analisadas da mesma forma, elimina as divergências devidas a diferentes graus de maturação ou de processos analíticos. Assim, as diferenças observadas para os parâmetros analisados devem-se principalmente a diferenças genéticas entre as diversas cultivares.

Os resultados obtidos mostraram que todas as variedades analisadas apresentam atividade antioxidante, detetada através de ensaios de avaliação da atividade redutora e de sequestro de espécies reativas de oxigénio, bem como atividade antimutagénica contra o butil-hidroperóxido (t-BHP). De forma inversa, nenhuma das variedades mostrou capacidade de quelação do Fe(II), atividade que pode, igualmente, ser encarada como um mecanismo de atividade antioxidante dado o papel que este ião desempenha nas reações de Fenton.

Das várias variedades estudadas, a Sharpblue foi a que apresentou teores em compostos fenólicos e, em particular, em antocianinas mais elevados. Da mesma forma, esta variedade foi a que apresentou, em todos os ensaios realizados, a maior capacidade antioxidante. Em contrapartida, a cultivar Misty apresentou o teor mais baixo em compostos fenólicos e apresentou a menor capacidade antioxidante nos ensaios FRAP, CUPRAC (igualada pela cultivar O’Neal) e sequestro do peróxido de hidrogénio. A cultivar O’Neal foi a que apresentou capacidade antioxidante mais baixa no ensaio ORAC. A cultivar Georgia Gem foi a que apresentou o teor de antocianinas mais baixo. Todas estas atividades antioxidantes parecem estar relacionadas com a presença de compostos fenólicos e, particularmente, com a presença de antocianinas no caso do sequestro do peróxido de hidrogénio.

Os valores específicos determinados neste trabalho devem, no entanto, ser encarados com prudência, dado que representam valores de um único ano, podendo esperar-se que estes variem de acordo com as condições climáticas de cada ano. Seria, portanto, bastante interessante verificar se noutros anos estes resultados se mantêm, continuando a variedade Sharpblue aquela que parece apresentar melhores propriedades bioativas.

Os produtos bioativos obtidos pela dieta sofrem diferentes processos de absorção e metabolização e, por isso, uma extrapolação dos efeitos que demonstram em ensaios *in vitro* para a saúde humana deve ser efetuada com cautela, pois os polifenóis têm biodisponibilidade limitada e podem ser extensamente metabolizados (Pantelidis *et al.*, 2007). De facto, o conhecimento da biodisponibilidade e da biotransformação dos polifenóis constituem fatores chave para poder especular sobre maior proteção contra o “stress” oxidativo que os antioxidantes presentes nos alimentos possam conferir. Apesar de poderem ser extensamente

metabolizados e de apresentarem uma limitada disponibilidade, estudos efetuados em humanos sugerem que, após a ingestão de alimentos contendo polifenóis, é possível atingir no plasma concentrações semelhantes àsquelas em que estes exercem os seus efeitos protetores nos ensaios *in vitro* (revisto em Ferguson, 2001; Williamson e Manach, 2005).

Em termos futuros seria de grande interesse fazer a determinação, por HPLC, do perfil em compostos fenólicos, em particular em antocianinas, das cultivares estudadas, de modo a tentar estabelecer relações entre as atividades biológicas e a presença ou ausência de compostos específicos, tentando identificar os principais compostos bioativos presentes nas diferentes variedades. Seria também de todo o interesse avaliar a atividade antimutagénica contra um maior número de compostos, incluindo mutagénicos não oxidativos e pré-mutagénicos, isto é, mutagénicos que necessitem de biotransformação para exercer os seus efeitos deletérios. O estudo da estabilidade dos componentes bioativos das diferentes variedades de mirtilos estudadas ao processo de digestão gastro-intestinal, e as suas potencialidades de absorção por linhas celulares de enterócitos humanos em cultura, poderá constituir um importante passo para a extrapolação dos efeitos benéficos observado *in vitro* para a situação *in vivo*.

Considera-se ainda que, estudos genéticos que visem o desenvolvimento de cultivares capazes de sintetizar mais compostos com capacidade antioxidante e o desenvolvimento de tecnologias de nanoencapsulamento dos compostos bioativos extraídos dos alimentos, que permitam controlar a incorporação ou a perda de compostos antioxidantes, são perspetivas futuras de grande interesse na área da tecnologia alimentar.

6. Referências Bibliográficas

- Al-Gubory KH, Fowler PA e Garrel C (2010) The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **42**(10), pp 1634–1650.
- Alves CQ, David JM, David JP, Bahia MV e Aguiar RM (2010) Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Química Nova*, **33**(10), pp 2202–2210.
- Angelo PM e Jorge N (2007) Compostos fenólicos em alimentos: Uma breve revisão. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, **66**, pp 1–9.
- Antunes LEC, Gonçalves ED, Ristow NC, Carpenedo S e Trevisan R (2008) Fenologia, produção e qualidade de frutos de mirtilo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **43**(8), pp 1011–1015.
- Apak R, Güçlü K, Demirata B, Özyürek M, Çelik SE, Bektaşoğlu B, Berker KI e Özyurt D (2007) Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, **12**, pp 1496–1547.
- Apak R, Güçlü K, Özyürek M e Karademir SE (2004) Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, pp 7970–7981.
- Barzilai A e Yamamoto KI (2004) DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair*, **3**, pp 1109–1115.
- Bektaşoğlu B, Çelik SE, Özyürek M, Güçlü K e Apak R (2006) Novel hydroxyl radical scavenging antioxidant activity assay for water-soluble antioxidants using a modified CUPRAC method. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **345**, pp 1194–1200.
- Benzie IFF e Strain JJ (1996) The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, **239**, pp 70–76.
- Bishop JM (1991) Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, **64**, pp 235–248.
- Bremer V, Crisosto G, Molinar R, Jimenez M, Dollahite S e Crisosto H (2008) San Joaquin Valley blueberries evaluated for quality attributes. *California Agriculture*, **62**(3), pp 91–96.
- Burdulis D, Ivanauskas L, Dirsė V, Kazlauskas S e Ražukas A (2007) Study of diversity of anthocyanin composition in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruits. *Medicina (Kaunas)*, **43**(12), pp 971–977.

Cadenas E e Davies KJA (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology & Medicine*, **29**(3/4), pp 222–230.

Cao G, Sofic E e Prior RL (1997) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology & Medicine*, **22**(5), pp 749–760.

Carlsen H, Myhrstad MCW, Thoresen M, Moskaug JØ e Blomhoff R (2003) Berry intake increases the activity of the glutamylcysteine synthetase promoter in transgenic reporter mice. *The Journal of nutrition*, **133**, pp 2137–2140.

Chobot V (2010) Simultaneous detection of pro- and antioxidative effects in the variants of the deoxyribose degradation assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, pp 2088–2094.

Cohen G (1999) *Reactive oxygen species in biological systems*. Gilbert and Colton. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, disponível em <http://www.springerlink.com/content/p6831637p0411u93/fulltext.pdf>.

Cohen G e Heikkila E (1974) The Generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *The Journal of Biological Chemistry*, **249**, pp 2447–2452.

Connor AM, Luby JJ, Tong CBS, Finn CE e Hancock JF (2002) Genotypic and environmental variation in antioxidant activity, total phenolic content, and anthocyanin content among Blueberry Cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **127**(1), pp 89–97.

Cotgreave IA, Moldéus P e Orrenius S (1988) Host biochemical defense mechanisms against prooxidants. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **28**, pp 189–212.

Cuendet M, Oteham CP, Moon RC e Pezzuto JM (2006) Quinone Reductase Induction as a Biomarker for Cancer Chemoprevention. *Journal of Natural Products*, **69**, pp 460–463.

Deaton CM e Marlin DJ (2003) Exercise-associated oxidative stress. *Clinical Techniques in Equine Practice*, **2**, pp 278–291.

Dorman HJD, Bachmayer O, Koşar M e Hiltunen R (2004) Antioxidant properties of aqueous extracts from selected *Lamiaceae* species grown in Turkey. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **52**, pp 762–770.

Dorman HJD, Koşar M, Kahlos K, Holm Y e Hiltunen R (2003) Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **51**, pp 4563–4569.

Duarte MPAC (2008) Desenvolvimento de novos sistemas de *Escherichia coli* competentes em biotransformação humana: Aplicação no estudo da metabolização de xenobióticos mediada pelos citocromos P450. Dissertação de Doutoramento apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 246p.

Dudonné S, Vitrac X, Coutière P, Woillez M e Mérillon JM (2009) Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, pp 1768–1774.

Dunlap W, Llewellyn L, Doyle J, e Yamamoto Y (2003) A microtiter plate assay for screening antioxidant activity in extracts of marine organisms. *Marine Biotechnology*, **5**(3), pp 294–301.

Duthie SJ (2007) Berry phytochemicals, genomic stability and cancer: Evidence for chemoprotection at several stages in the carcinogenic process. *Molecular Nutrition & Food Research*, **51**, pp 665–674.

Ehlenfeldt MK e Prior RL (2001) Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, pp 2222–2227.

Esmaeili MA e Sonboli A (2010) Antioxidant, free radical scavenging activities of *Salvia brachyantha* and its protective effect against oxidative cardiac cell injury. *Food and Chemical Toxicology*, **48**, pp 846–853.

Espín JC, García-Conesa MT e Tomás-Barberán FA (2007) Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry*, **68**, pp 2986–3008.

Ferguson LR, Philpott M e Karunasinghe N (2004) Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology*, **198**, pp 147–159.

Ferguson LR (2001) Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, **475**, pp 89–111.

Ferrari C e Torres E (2002) Novos compostos dietéticos com propriedades anticarcinogénicas. *Revista Brasileira de Cancerologia*, **48**(3), pp 375–382.

Ferreira ICFR e Abreu R (2007) Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanalise*, **IV**(2), pp 32–39.

Ferreira ALA e Matsubara LS (1997) Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, **43**, pp 61–68.

Fonseca LL e Oliveira PB (2007) A planta de mirtilo, Morfologia e fisiologia. *Divulgação AGRO*, **556(2)**, pp 1–24.

Fukumoto L e Mazza G (2000) Assessing antioxidant and prooxidant activity of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, pp 3597–3604.

Galletta GJ e Ballington JR (1996) Blueberries, cranberries, and lingonberries. In: Jules Janick and James Moore (eds.) *Fruit Breeding, Vol. II, Vine and Small Fruits*. John Wiley and Sons, New York, USA, pp 1–107.

Galvano F (2008) Protocatechuic acid: The missing human cyanidins' metabolite. *Molecular Nutrition & Food Research*, **52**, pp 386–387.

Geckil H, Ates B, Durmaz G, Erdogan S e Yilmaz I (2005) Antioxidant, free radical scavenging and metal chelating characteristics of propolis. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, **1**, pp 27–31.

Giovanelli G e Buratti S (2009) Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties. *Food Chemistry*, **112**, pp 903–908.

Gülçin I, Oktay M, Küfrevioğlu ÖI e Aslan A (2002) Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L) Ach. *The Journal of Ethnopharmacology*, **79**, pp 325–329.

Gülçin I (2006a) Antioxidant and antiradical activities of l-carnitine. *Life Sciences*, **78**, pp 803–811.

Gülçin I (2006b) Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, **217**, pp 213–220.

Halliwel B, Aeschbach R, Löliger J e Aruoma OI (1995) The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, **33(77)**, pp 601–617.

Heim KE, Tagliaferro AR e Bobilya DJ (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**, pp 572–584.

Hollman P e Katan M (1997) Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedical and Pharmacology Journal*, **51**, pp 305–310.

Huang D, Ou B e Prior RL (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, pp 1841–1856.

Kader A (1996) Maturity, ripening and quality relationships of fruit-vegetables. *Acta Horticulture*, ISHS, Davis, USA, **434**, pp 249–255.

Kader F, Rovel B, Girardin M e Metche M (1996) Fractionation and identification of the phenolic compounds of Highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum*, L.) *Food Chemistry*, **55**(1), pp 35–40.

Koca I e Karadeniz B (2009) Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey. *Scientia Horticulturae*, **121**, pp 447–450.

Kosar M, Fatih G e Baser KHC (2008) *In vitro* antioxidant properties and phenolic composition of *Salvia virgata* Jacq. from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, pp 2369–2374.

Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE e Etherton TD (2002) Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, **113**(9B), 71S–88B.

Lavadinho C, Sousa M e Moldão-Martins M (2001) Influência da data de colheita na qualidade do mirtilo. *Atas 5º Encontro de Química de Alimentos: Qualidade, Segurança, Inovação*, pp 346–348, disponível em http://www.crcvirtual.org/vfs/old_crcv/biblioteca/5_encontro/5_Encontro.pdf, acedido em 29 de novembro de 2010.

Lee J, Durst RW e Wrolstad RE (2005) Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *The Journal of AOAC International*, **88**, pp 269–278.

Lyrene PM e Williamson JG (1997) Highbush blueberry varieties for Florida. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, **110**, pp 171–174.

Magalhães LM, Segundo MA, Reis S e Lima JLFC (2008) Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, **613**, pp 1–19.

Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A e Rémésy C (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **81**(suppl), pp 230S–242S.

Maron DM e Ames BN (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity testing. *Mutation Research*, **113**, pp 173–215.

Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM e Tuñón MJ (2002) Revisión Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, **6**, pp 271–278.

Micelli N, Trovato A, Dugo P, Cacciola F, Donato P, Marino A, Bellinghieri V, La Barbera TM, Güvenç A e Taviano MF (2009) Comparative analysis of flavonoid profile, antioxidant and antimicrobial activity of the berries of *Juniperus communis* L. var. *communis* and *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, pp 6570–6577.

Migliore L e Coppedè F (2009) Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutation Research*, **674**, pp 73–84.

Molina JM, Calvo D, Medina JJ, Barrau C e Romero F (2008) Fruit quality parameters of some southern highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) grown in Andalusia (Spain). *Spanish Journal of Agricultural Research*, **6(4)**, pp 671–676.

Moon JK e Shibamoto T (2009) Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, pp 1655–1666.

Mortelmans K e Zeiger E (2000) The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, **455**, pp 29–60.

Nakamura S, Kato A e Kobayashi K (1992) Enhanced antioxidative effect of ovalbumin due to covalent binding of polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**, pp 2033–2037.

Neto C (2007) Cranberry and blueberry: Evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Molecular Nutrition & Food Research*, **51**, pp 652–664.

Neves JM, Matos CM, Moutinho CG, Gomes LR e Teixeira T (2009) Atividade antioxidante e avaliação *in vitro* da citotoxicidade de extratos aquosos de folhas de mentha x piperita. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*, **6**, pp 344–354.

Nordberg J, Arnér ESJ (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine*, **31(11)**, pp 1287–1312.

Ochmian I, Grajkowski J, Miliciuk G, Ostrowska K e Chelkowski P (2009) Mineral composition of high blueberry leaves and fruits depending on substrate type used for cultivation. *Journal of Elementology*, **14(3)**, pp 509–516.

Oliveira AC, Valentim IB e Goular MOF (2009) Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, **32(3)**, pp 689–702.

Ou B, Hampsch-Woodill M e Prior RL (2001) Development and validation of an improved Oxygen Radical Absorbance Capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, pp 4619–4626.

Pagot E (2006) Cultivo de pequenas frutas: amora-preta, framboesa, mirtilo, EMATER/RS-ASCAR, Porto Alegre, 41p.

Pantelidis GE, Vasilakakis M, Manganaris GA e Diamantidis GR (2007) Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry*, **102**, pp 777–783.

Prior RL, Cao G, Martin A, Sofic E, McEwen J, O'Brien C, Lischner N, Ehlenfeldt M, Kalt W, Krewer G e Mainland CM (1998) Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, pp 2686–2693.

Prior RL, Wu X e Schaich K (2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, pp 4290–4302.

Ramful D, Baborun T, Bourdon E, Tarnus E e Aruoma OI (2010) Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*, **278**, pp 75–87.

Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK e Kumar MNVR (2006) Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, **113**, pp 189–207.

Ritchie JC (1956) *Vaccinium myrtillus* L.. *Journal of Ecology, British Ecological Society*, **44(1)**, pp 291–299.

Ruel G e Couillard C (2007) Evidences of the cardioprotective potential of fruits: The case of cranberries. *Molecular Nutrition & Food Research*, **51**, pp 692–701.

Saftner R, Polashock J, Ehlenfeldt M e Vinyard B (2008) Instrumental and sensory quality characteristics of blueberry fruit from twelve cultivars. *Postharvest Biology and Technology*, **49**, pp 19–26.

Santos C (2007) Estatística Descritiva - Manual de Autoaprendizagem, Edições Sílabo, Lisboa.

Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C e Jimenez L (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **45(4)**, pp 287–306.

Sellappan S, Akoh CC e Krewer G (2002) Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown Blueberries and Blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, pp 2432–2438.

- Silva JL, Marroquin E, Matta FB, Garner JO e Stojanovic J (2005) Physicochemical, carbohydrate and sensory characteristics of highbush and rabbiteye blueberry cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **85**, pp 1815–1821.
- Silva MM, Santos MR, Caroço G, Rocha R, Justino G e Mira L (2002) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: A reexamination. *Free Radical Research*, **36**, pp 1219–1227.
- Silva SD, Antunes LEC, Anthonisen DG, Lemões JS e Gonçalves ED (2008) Caracterização de genótipos de mirtilo utilizando marcadores moleculares. *Revista Brasileira de Fruticultura*, **30(1)**, pp 180–184.
- Silveira NGA, Vargas PN e Rosa CS (2007) Teor de polifenóis e composição química do mirtilo do grupo highbush. *Alimentos e Nutrição*, **18(4)**, pp 365–370.
- Singleton VL, Orthofer R e Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, **299**, pp 152–178.
- Skupień K (2006) Chemical composition of selected cultivars of highbush blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L.). *Folia Horticulturae*, **18**, pp 47–56.
- Smith M, Marley KA, Seigler D, Singletary KW e Meline B (2000) Bioactive properties of wild blueberry fruits. *Journal of food science – Sensory and Nutritive Qualities of Food*, **65(2)**, pp 352–356.
- Sousa MB, Curado T, Vasconcelos FN e Trigo MJ (2007) Mirtilo – Qualidade pós-colheita. *Divulgação AGRO*, **556(8)**, disponível em http://www.inrb.pt/fotos/editor2/inia/manuais/8__mirtilo__qualidade_pos_colheita.pdf.
- Stryer L (1988) *Biochemistry*. Third edition, W. H. Freeman and Company, New York.
- Stull AJ, Cash KC, Johnson WD, Champagne CM e Cefalu WT (2010) Bioactives in blueberries improve insulin sensitivity in obese, insulin-resistant men and women. *The Journal of Nutrition*, **140**, pp 1764–1768.
- Toyokuni S (1999) Reative oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathology International*, **49(2)**, pp 91–102.
- Turkmen I e Eks A (2011) Brix degree and sorbitol/xylitol level of authentic pomegranate (*Punica granatum*) juice. *Food Chemistry*, **12**, pp 118.

Valentão P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM e Bastos ML (2001) Antioxidant activity of *Centaureum erythraea* infusion evidenced by its superoxide radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, pp 3476–3479.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M e Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **39**(1), pp 44–84 .

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M e Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemical-Biological Interactions*, **160**(1), pp 1–40.

Wang H, Cao G e Prior RL (1996) Total Antioxidant Capacity of Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, pp 701–705.

Wang SY, Cheng CT, Sciarappa W, Wang CY e Camp MJ (2008) Fruit quality, antioxidant capacity, and flavonoid content of organically and conventionally grown blueberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, pp 5788–5794.

Wang SY e Stretch AW (2001) Antioxidant capacity in cranberry is influenced by cultivar and storage temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, pp 969–974.

Williamson G e Manach C (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **81** (suppl), pp 243S–245S.

Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH e Loeb LA (2004) Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, **14**, pp 473–486.

Yen GC e Chen HY (1995) Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**(1), pp 27–32.

Yen GC, Chen HY e Peng HH (2001) Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. *Food and Chemical Toxicology*, **39**, pp 1045–1053.

You Q, Wang B, Chen F, Huang Z, Wang X e Luo PG (2011) Comparison of anthocyanins and phenolics in organically and conventionally grown blueberries in selected cultivars. *Food Chemistry*, **125**, pp 201–208.

Zafra-Stone S, Yasmin T, Bagchi M, Chatterjee A, Vinson JA e Bagchi D (2007) Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition & Food Research*, **51**, pp 675–683.

Zhang Y, Vareed SK e Nair MG (2005) Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. *Life Sciences*, **76(13)**, pp 1465–1472.

Zheng W e Wang SY (2003) Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in Blueberries, Cranberries, Chokeberries, and Lingonberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, pp 502–509.

Portais da Internet

USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 23 (2010), disponível em http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl, acessado a 28 de novembro de 2010.

Observatório dos Mercados agrícolas e das Importações agroalimentares disponível em http://www.observatorioagricola.pt/item.asp?id_item=115 acessado a 4 de dezembro de 2010.